

明 細 書

バイオチップ

技術分野

- [0001] 本発明は、核酸の配列情報の決定、遺伝子の発現・変異・多様性などの解析、および、目的タンパク質の精製・同定、タンパク質の発現・相互作用・翻訳後修飾等の機能解析に利用するバイオチップに関し、詳しくは、バイオチップの形状・微細構造・表面改質・温度調節に関する。

背景技術

- [0002] 従来、環境事業のマーケットでは、土壌浄化と水安全性の領域で問題となる微生物の動態を的確に把握したいという強い要請がある。つまり、上下水道に存在する病原微生物の存在を連続又はリアルタイムにモニタリングすることや、水の安全基準となる大腸菌群、腸内細菌群などを迅速、かつ、正確に定量、同定したいという需要である。また、土壌修復事業の分野でも原位置修復に先立って、対象汚染土壌にどのような微生物が存在しているのかを正確に調べることにより、的確な修復方法を提案したいという要求もある。さらに、有用微生物を導入するバイオオーギュメンテーションに用いる指標微生物の動態調査、事前事後の土壌診断等、種々の環境事業分野において微生物の的確な動態把握が要求されている。
- [0003] しかしながら、現状では研究室に試料を持ち帰って熟練した検査官によって培養や顕微鏡観察によって検査されており、連続的または現場サイドでリアルタイムにモニタリングを行うことは困難であった。近年、微生物のリボゾームRNA遺伝子の塩基配列解析による同定等、遺伝子レベルでの検出方法が報告されているが、何れも研究室レベルに留まり、現場で使われていることは希であり、微生物属以下の種の同定に関してはほとんど対応することができていないというのが現状であった。これらの現状を鑑みて、微生物属以下の種の同定に関して、種間での遺伝子多型性に焦点をあてた種レベルでの識別方法が試みられている。
- [0004] また、近年のゲノムプロジェクトに代表される遺伝子解析研究の進展に伴い、遺伝子研究は新たな段階を迎えつつあり、今後はゲノム上に存在する遺伝子の機能解析

の研究が非常に重要になりつつある。生体における遺伝子は、時間的かつ空間的に調整されており、この調節機構を網羅的に解明する遺伝子発現モニタリング研究が進められている。また、ヒトゲノムのDNAの塩基配列は人により異なっており、特に、1塩基が異なる状態は一塩基多型(SNP)と呼ばれ、かかる相違は個々の薬剤感受性や罹病性の相違に関連するとして、疾病に関連する遺伝子のマッピング、ゲノム新薬、テーラーメイド医療の実現にむけた遺伝子多型の解析研究が進められている。

[0005] そして、現在、ヒトゲノムプロジェクトの終了に伴うポストゲノム時代への移行により、その研究対象が、DNAからタンパク質に移行しつつあり、プロテオーム解析に関心が集まっている。

[0006] このような近年のゲノム解析或いはプロテオーム解析を遂行する上で、大量のDNA或いはタンパク質を網羅的に解析するためにバイオチップが広範に導入され、核酸の配列情報の決定、遺伝子の発現・変異・多様性などの解析、および、目的タンパク質の精製・同定、タンパク質の発現・相互作用・翻訳後修飾等の機能解析に利用されている。このようなバイオチップとして、マイクロアレイ技術により製造されたDNAチップやプロテインチップが知られており、さらに、例えばDNAチップとして、DNAをガラス等の基板上に高密度に整列固定化することにより作製されるDNAマイクロアレイ、複雑な流路や反応チャンバが形成してあるマイクロ流体デバイスといった所謂マイクロリアクター等が知られている。

[0007] また、プロテオーム解析への関心の高まりに伴い、プロテインチップが脚光を浴びている。タンパク質の情報はDNAによりコードされているため、DNAマイクロアレイ解析で事足りる場合が多いとはいえ、細胞内情報伝達の根幹をなすリン酸化、分子認識や細胞間相互作用に重要な役割を果たす糖鎖付加等の、タンパク質の翻訳後修飾や、分泌により組織や細胞から解離したタンパク質の動態解析などは、DNAの塩基配列やmRNA量からだけでは予測できないことから、タンパク質を一度に大量解析するためのプロテインチップの開発、実用化が切望されている。

以下に、上述したバイオチップの形状・微細構造・表面改質・温度調節について詳述する。

[0008] (バイオチップの形状)

多種類の遺伝子を網羅的に解析することができるマイクロアレイ技術は、包括的な遺伝子発現モニタリング、ゲノムの変異、多型性を検出する上で、ポストゲノム時代の重要な基盤技術として、環境事業分野、医療分野から基礎生物学の分野まで注目されている。特に、ここ数年来、DNAマイクロアレイ技術は、飛躍的な技術的進歩を遂げている。DNAマイクロアレイとは、ミクロな技術を使って、ガラス等の基板上に高密度に整列固定化された遺伝子DNAに対して、蛍光分子等で標識した標的核酸をハイブリダイゼイズさせ、基板上に結合した標識を蛍光スキャナー等で画像化し、解析処理するというものである。

[0009] DNAマイクロアレイは、その製造方法により、光リソグラフィタイプとスポッティングタイプに大別される。光リソグラフィタイプは光リソグラフィとコンビナトリアルケミストリーを融合させることにより、オリゴヌクレオチドを基板上に合成する方法である。具体的には、基板上に結合した塩基を光によって脱離する官能基で保護し、反応部位のみを照射できるような光リソグラフィック・マスクを用いることにより特定領域の塩基だけに光を照射して官能基を脱離させた後、水酸基が保護された塩基と反応させ、基板上の保護基が脱離している塩基とカップリングさせるという工程を繰り返すことにより、数十万種類のオリゴヌクレオチドをガラス基板上に合成するものである(例えば、非特許文献1、特許文献1参照)。一方、スポッティングタイプは、ロボットアームによってDNAを基板上に並べて付着(スポット)させて高密度DNAマイクロアレイを作製する方法であり、高精細度の高速ロボットスポッターを用いることにより、予め調製したDNAプローブを、固相化剤によりコーティングした基板上に高密度にスポットするものである(例えば、非特許文献2、特許文献2参照)。既に調製してあるプローブを使うことにより、研究者の望みのDNAマイクロアレイをつくることができる。

[0010] しかしながら、DNAマイクロアレイ技術は開発途上の段階にあり、解決すべき技術上の問題点があった。光リソグラフィタイプは、設計、作成に時間がかかり高価であるため、使用が一部の研究機関に限られるのが現状であった。一方、スポッティングタイプは、基板上にDNAプローブを含む液滴を微量滴下することにより、基板上にDNAプローブを固定化するため、滴下された液滴が基板表面で拡散し、隣接するス

ポットを干渉してコンタミネーションを起すという問題点があり、更に、各スポットの密度と均一性を確保できないため、精度、再現性の面でも満足できるものではなかった。また、スポット部の周囲に付着した固相化剤の存在によりターゲットDNAが非特異的に基板上に吸着し、ノイズを上昇させてS/N比を低下させるという問題点もあった。

[0011] そして、マイクロアレイに光を照射した際に発生する蛍光には、蛍光標識から発生する蛍光の他に、基板自体から発生する蛍光が含まれるため、これがバックグラウンドとなり、S/N比を低下させるという問題点があった。また、検出に際しては、通常、市販のマ

イクロアレイスキャナーを用いて各スポットの蛍光を検出しデータを得ているが、レーザー発振機や光学系システムは非常に高価であり、また、高精度の検出のためには、スポットの位置をマイクロスキャナーに正確に位置決めをする必要があった。したがって、従来法は、精度面、また、コスト面、操作の簡便性の観点から、十分満足できるものであるとは言い難かった。

[0012] 従って、上記したようなマイクロアレイ技術に係る実状に鑑みると、DNAマイクロアレイ等のバイオチップにおいては、低コストに製造および検出することができ、操作が簡便かつS/N比が高く精度よい検出を実現できるものであれば好ましい。

[0013] (バイオチップの微細構造)

ポリジメチルシロキサン(polydimethylsiloxane、以下、PDMSと略する。)は、シリコンエラストマーの一種である。PDMSを主成分とする樹脂基材であるPDMS基材は、透明性が極めて高く、光学的特性に優れており、広い波長領域での吸収が小さい。特に、可視光領域での吸収が極めて小さく、蛍光検出にもほとんど影響しないという特性を有する。

また、鋳型に対する追従性が高く、ナノからミクロンオーダーでの微細加工が容易であることから各種光学的機器に最適な形に成形できる等、任意の微細構造に成形しやすいという特性を有している。更に、鋳型法を用いることにより安価に微細構造物を構築することができるとして、ナノ・バイオ融合テクノロジーの分野において注目されている。

また、PDMS基材はそれ自体、ガラス、アクリル樹脂などと密着性がよい性質を有しており、微細加工を施されたPDMS基材に平坦なガラス、アクリル樹脂部材を当接させることにより、流路や、チャンバーを形成することが可能である。

[0014] このようなPDMS基材の性質を利用し、ナノテクノロジーとバイオテクノロジーを融合させることにより、PDMS基材により形成されたマイクロチップに微細加工を施し、当該マイクロチップ上にキャピラリーチャンネルを形成したキャピラリーゲル電気泳動用マイクロチップが報告されている(例えば、特許文献3参照)。

[0015] しかしながら、PDMS基材の主成分はPDMSであるが、PDMSだけでは重合は起こらず、側鎖にビニル基、アルコキシ基等を持つシロキサン化合物が入ることによって所々で架橋が起こり、網目構造を形成する。このため、一般的に気体透過性が高く、チャンバーを構成する基材の主成分としてPDMSを用いた場合、チャンバー内部の水分の蒸発という問題があった。DNAチップ、プロテインチップは、微量試料を対象とするため、水分の蒸発が反応系に与える影響が大きく、また、試料を担持させたままの長期保存には適さないという問題点があった。特に、DNAチップでは、ハイブリダイゼーション等高温で反応を行う段階での水分蒸発は大きな問題である。また、プロテインチップを構築する場合には、タンパク質の構造、活性が湿潤な条件下でしか、維持することが出来ないため、特に、水分の蒸発が与える影響は大きい。

[0016] また、PDMSは疎水性であるため、色素が沈着しにくい。そのため、酵素標識等による可視光検出に適用することができず、レーザー光検出を行う必要がある。しかしながら、レーザー光検出は感度もよく優れた方法ではあるが、検出のための機器が高価であることが起因して検出にかかるコストが高かった。

[0017] 従って、上記したようなPDMSマイクロチップに係る実状に鑑みると、マイクロアレイ等のバイオチップにおいては、反応領域の気密性が向上された高精度の検出が可能な、かつ、DNAチップならびにプロテインチップとしても利用可能なバイオチップおよびその製造方法を提供し、引いては、可視光検出にも適用可能なバイオチップを提供することにより、更なる低コスト化を実現できるものであれば好ましい。

[0018] (バイオチップの表面改質)

上述のマイクロリアクターは、半導体等の微細加工技術(MEMS)を応用して製造

されている。例えば、基材中に、サンプル注入孔やサンプル排出孔、微小な毛細管状の流体流路、或いは、この流路と接続する反応領域としての反応チャンバ・電気泳動カラム・膜分離機構等の構造が形成される。このようなマイクロアクターは、主にDNA分析デバイス・微小電気泳動デバイス・微小クロマトグラフィーデバイス・微小センサー等のように、生体試料を測定する用途で使用される。

従来、シリコン基板の表面に異方性エッチングにより形成された複数の独立した反応チャンバと、シリコン基板の表面に陽極接合され反応チャンバを密閉する平板(耐熱ガラス)とからなるマイクロアクターが知られていた(例えば、特許文献4参照)。このマイクロアクターを集積すれば、多数の生化学反応を同時に並列的に行うことができる。

[0019] 上述したように、バイオチップの構成材料としてガラスが利用されている。ガラスには、安価に入手でき、耐薬品性に優れているといった長所がある反面、加工が難しく、紫外線(UV)の吸収があるため検出系でUVを利用する用途には向かない等の欠点がある。

一方、ガラスの他にシリコン樹脂がバイオチップの構成材料として利用されているが、このシリコン樹脂のうち、成形容易性および光学的特性の観点から、特に、上述したPDMS基材が注目されている。

[0020] ここで、PDMS基材の主成分であるPDMSは、DNA及びタンパク質といった生体関連分子との親和性に乏しい不活性な官能基しか有しないため、PDMS基材表面は疎水性となって不活性な表面特性を有する。そのため、PDMS基材表面に、生体関連分子や、生化学反応に関わる各種化学物質等を固定するのが困難である。

[0021] 一方、生体関連分子は一般に親水性であるものが多く、水酸基、アミノ基、及び、カルボキシル基といった官能基との親和性は高い。そのため、PDMS基材表面がこれら官能基を持ち、例えば親水性で表面活性の高い特性を有すれば、生体関連分子を基材表面上に固定し易くなり、当該マイクロアクター上での生化学反応をより確実に行えると考えられる。

[0022] つまり、マイクロアクターを、生化学反応を行うリアクターとして用いる場合、生体関連分子や各種化学物質を直接基板表面に結合させることが重要となる。そのため、

マイクロリアクターの構成材料の主材としてPDMSを採用した場合、例えば反応が行われるチャンバの表面を、生体関連分子や各種化学物質との親和性が向上するように親水化する等して、表面活性を向上させる改質を行うことが考えられる。

[0023] このような表面特性改質として、PDMS基材表面に対して紫外線(UV)照射処理を行う、或いは、PDMS基材表面に対して紫外線-オゾン(UVO)処理により光オゾン酸化を行う技術が知られていた(例えば、非特許文献3参照)。これら処理により、PDMS基材表面に水酸基等を有するように改質できるため、PDMS基材表面を親水化することが可能となっていた。

[0024] 他にも、PDMS基材表面に対して強アルカリ処理を行う、或いは、プラズマ照射装置等を用い、PDMS基材表面に対して酸素ラジカル照射処理を行うことによりPDMS基材表面に水酸基が生成され、PDMS基材表面を親水化することができる。

[0025] このようなPDMS基材表面の特性改質において、PDMS基材表面に対してUV照射処理やUVO処理を行った場合、或いは、強アルカリ処理を行った場合、PDMS基材表面にひび割れが発生して白濁し、透明性が著しく損なわれるという問題点があった。これは、PDMS基材表面に対する紫外線暴露により、PDMSの分子鎖が破壊されることに起因すると考えられる。

マイクロリアクターをDNA分析デバイスとして利用した場合、当該マイクロリアクター上での生化学反応後に、色素或いは蛍光標識したDNAの検出を行うことがある。このとき、当該マイクロリアクターの透明性が損なわれていると、スキャナーでの蛍光検出が困難となり、正確なDNA分析を行うことができない。

[0026] また、PDMS基材表面に対して酸素ラジカル照射処理を行った場合、生成した水酸基は安定せず、一過性の表面改質にしかないという問題点があった。また、非常に高価なプラズマ照射装置等を用いるため、製造コストが高くなるという問題点があった。製造コストが高いと、PDMSをマイクロリアクターの構成材料として広く普及させるのに妨げとなる。

[0027] 従って、上記したようなマイクロリアクターに係る実状に鑑みると、マイクロリアクター等のバイオチップにおいては、基材表面の活性化後も優れた透明性を維持し、コスト

パフォーマンスに優れたバイオチップを製造できるシリコン樹脂の表面改質方法があれば好ましい。

[0028] (バイオチップの温度調節)

加熱或いは冷却して対象物(温度調節対象物)の温度を調節するために、ペルチェ効果を有するペルチェ素子を利用することが知られている。

[0029] ペルチェ効果とは、異種の導体の接触面を通じて電流を流したとき、その接触面で熱量の発熱または吸熱が起きる現象のことであり、このペルチェ効果を利用して加熱或いは冷却効果を生み出す部材をペルチェ素子という。そして、ペルチェ素子は電流の向きを変えると発熱面と吸熱面とが逆転する。ペルチェ素子の基本構造は、通常、電極間に熱電半導体チップを挟む形状を有している。

[0030] 上述したバイオチップの一種であるDNAチップ(例えばサンプル注入孔・サンプル排出孔・流体流路・反応チャンバ等を設けたマイクロリアクター)上ではDNA断片増幅やハイブリダイゼーション等の反応を行うことが可能となっている。

これら反応をDNAチップ上で行うに際し、DNAチップの温度を調節する必要がある。DNAチップの温度を調節する温度調節装置として、上述したペルチェ素子を利用したDNA断片増幅装置が知られていた(例えば、特許文献5参照)。

[0031] このDNA断片増幅装置は、温度調節対象物であるDNAチップを載置する伝熱ブロックと、ペルチェ素子と、放熱手段であるヒートシンクとを順に配設して構成してある。

このように構成することで、DNAチップを、伝熱ブロックを介してペルチェ素子により効果的に温度調節することが可能となっていた。

[0032] ある時点で温度調節対象物が有する温度(現有温度)と目標温度との差がある程度大きいとき、例えば、室温(現有温度)から94℃(目標温度)まで昇温させるような場合、温度調節対象物を目標温度に到達させるのに時間を要するという不都合があった。

[0033] ここで、前記DNA断片増幅装置に限らず、温度調節対象物を昇温或いは降温する工程を迅速に行うことができれば、温度調節対象物を処理する時間が短縮できるため、好ましい。

[0034] また、DNA増幅時にDNAチップを加温すると、サンプル注入孔やサンプル排出孔等からサンプルDNAを含んだ反応液が蒸発するため、実験工程の確実な遂行が困難である

という問題点があった。

[0035] 従って、上記したようなPDMSマイクロチップに係る実状に鑑みると、マイクロアレイ等のバイオチップにおいては、所望の温度に迅速に到達可能で、かつ、反応液の蒸発を防止可能なバイオチップ反应用温度調節器により反応させるのが好ましい。

[0036] 特許文献1:米国特許第5, 744, 305号

特許文献2:米国特許第5, 807, 522号

特許文献3:日本特開第2001-157855号公報

特許文献4:日本特開平10-337173号公報

特許文献5:日本特開2002-306154号公報

非特許文献1:Foder SP, Rava RP, Huang XC, Pease AC, Holmes CP, Adams CL「生物学的チップによるマルチプレクス型生化学的アッセイ(Multiplexed biochemical assays with biological chips)」1993年 ネイチャー(Nature) 第364巻 p555-556

非特許文献2:Shena, M., Shalon, D., Davis, R. W., および Brown, P. O., 「相補DNAマイクロアレイによる遺伝子発現パターンの定量的モニタリング(Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray)」, 1995年、サイエンス(Science)、第270巻、p. 467-470

非特許文献3:K.Efimenko、William E.Wallace、J.Genzer、“Surface Modification of Sylgard-184 Poly(dimethyl siloxane) Networks by Ultraviolet and Ultraviolet/Ozone Treatment”、Journal of Colloid and Interface Science 254, 306-315 (2002)

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0037] 以上より、本発明の第1の目的は、バイオチップの形状に関し、低コストに製造および検出することができ、操作が簡便かつS/N比が高く精度よい検出を実現できるバ

イオチップを提供することにある。

また、本発明の第2の目的は、バイオチップの微細構造に関し、反応領域の気密性が向上された高精度の検出が可能な、かつ、DNAチップならびにプロテインチップとしても利用可能なバイオチップおよびその製造方法を提供し、引いては、可視光検出にも適用可能なバイオチップを提供することにより、更なる、低コスト化を実現することにある。

また、本発明の第3の目的は、バイオチップの表面改質に関し、基材表面の活性化後も優れた透明性を維持し、コストパフォーマンスに優れたバイオチップを製造できるシリコン樹脂の表面改質方法を提供することにある。

さらに、本発明の第4の目的は、バイオチップの温度調節に関し、所望の温度に迅速に到達可能で、かつ、反応液の蒸発を防止可能なバイオチップ反応用温度調節器を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0038] [1]バイオチップの形状

本発明の「バイオチップの形状」に係る構成を以下に示す。

[0039] 本発明の特徴構成は、第1部材と第2部材との間に生体関連分子を担持する生体関連分子バイオチップであって、

前記第1部材もしくは前記第2部材の何れか一方において、他方の部材に対する接触面

に複数の溝を並列形成し、反応領域となる空間を複数設けてある点にある。

[0040] 本発明者らは、上記目的を達成するため、鋭意検討した結果、微細加工技術を用いて、試料を担持させる反応領域を線形状の空間として複数並列的に配置することにより、試料間の干渉を防止した高精度な検出を実現できると共に、安価なラインセンサーにより簡便かつ高精度にデータの読み取りが可能であることを見出した。更に、微細加工される部材として、ポリジメチルシロキサンに着目することにより、更なる低コスト化、および簡便かつ高精度の検出を実現できることを見出した。これらの知見を基礎として本発明を完成するに至った。

[0041] つまり、本構成は、複数の並列する、線形状の反応領域となる空間を設けた生体関

連分子バイオチップに関し、該空間に生体関連分子を担持することにより、生体関連分子によって選択的に捕獲される標的物質を検出するものである。

[0042] 従って、本構成であれば、第1部材もしくは前記第2部材の何れか一方に形成された複数の線状形空間に区画成形された反応領域に試料を流し込むことから、隣接する反応領域による干渉を防止できる共に、ターゲットDNAの非特異的な基板上への吸着を防止でき、ノイズを低減できることから、高精度な検出が可能となる。

[0043] また、本発明の特徴構成は、第1部材と第2部材との間に生体関連分子を担持する生体関連分子バイオチップであって、

前記第1部材および前記第2部材の互いの接触面に複数の溝を並列形成し、反応領域となる空間を複数設けてある点にある。

[0044] 本構成であれば、第1部材および前記第2部材の互いの接触面により形成された複数の線状形空間に区画成形された反応領域に試料を流し込むことから、隣接する反応領域による干渉を防止できる共に、ターゲットDNAの非特異的な基板上への吸着を防止でき、ノイズを低減できることから、高精度な検出が可能となる。

[0045] また、本発明の特徴構成は、第1部材と第2部材との間に生体関連分子を担持する生体関連分子バイオチップであって、

前記第1部材には、前記第2部材に対する接触面に複数の線形凸部を並列形成し、前記第2部材には、前記第1部材に対する接触面に前記線形凸部と一対一に嵌合可能な複数の線形溝部を並列形成し、

前記線形凸部と前記線形溝部とを嵌合させつつ、前記第1部材と前記第2部材とを当接させたとき、前記線形凸部と前記線形溝部との間に反応領域となる空間が形成されるように構成してある点にある。

[0046] 本構成であれば、前記第1部材の線形凸部と前記第2部材の線形溝部との嵌合により形成された線状形空間に区画成形された反応領域に試料を流し込むことから、隣接する反応領域による干渉を防止できる共に、ターゲットDNAの非特異的な基板上への吸着を防止でき、ノイズを低減できることから、高精度な検出が可能となる。

更に、基板表面において、反応領域と、反応領域以外の領域との間に、高低差を設けることにより、バックグラウンド蛍光等を低減させることが可能となり、S/N値を向

上させることが可能となる。

- [0047] また、本発明の特徴構成は、前記反応領域と外部を連通可能とし、前記反応領域に試料を供給する試料供給口と反応領域から試料を回収する試料回収口を設けてある点にある。
- [0048] 本構成であれば、試料の供給を適切な試料供給手段により、或いは、試料の回収を適切な試料回収手段等により容易に行うことができる。
- [0049] また、本発明の特徴構成は、前記第1部材および前記第2部材のうち少なくとも何れか一方を構成する基材が、ポリジメチルシロキサン(PDMS)、もしくは、ポリメタクリル酸メチル(PMMA)など透明シリコンゴムあるいはプラスチック樹脂である点にある。
- [0050] 本構成であれば、光学的特性や成形容易性に優れたPDMSやPMMA等を、基板を構成する基材として使用することにより、低バックグラウンドを達成でき、高いS/N比により検出が可能となる共に、成形容易性にも優れていることから、ナノ、ミクロンオーダーでの加工が容易となり、各種光学的機器に最適な形に製造が可能となり、鋳型を用いた成形方法を採用することにより、大量生産を可能とし、更なるコスト削減効果が期待できる。
- [0051] また、本発明の特徴構成は、生体関連分子を担持する生体関連分子バイオチップであって、複数の線状反応領域を並設したバイオチップ本体を有する点にある。
- [0052] 本構成であれば、線状形空間に区画成形された反応領域に試料を流し込むことから、隣接する反応領域による干渉を防止できる共に、ターゲットDNAの非特異的な基板上への吸着を防止でき、ノイズを低減できることから、高精度な検出が可能となる。
- [0053] また、本発明の特徴構成は、前記バイオチップ本体を構成する基材が、ポリジメチルシロキサン(PDMS)、もしくは、ポリメタクリル酸メチル(PMMA)など透明シリコンゴムあるいはプラスチック樹脂である点にある。
- [0054] 本構成であれば、光学的特性や成形容易性に優れたPDMSやPMMA等を、基板を構成する基材として使用することにより、低バックグラウンドを達成でき、高いS/

N比により検出が可能となる共に、成形容易性にも優れていることから、ナノ、ミクロンオーダーでの加工が容易となり、各種光学的機器に最適な形に製造が可能となり、鋳型を用いた成形方法を採用することにより、大量生産を可能とし、更なるコスト削減効果が期待できる。

[0055] ここで、本明細書中の「生体関連分子バイオチップ」という用語は、生体関連分子が担持される、もしくは、実際に担持されたバイオチップを意味し、実際に担持されていないものも含む概念である。

「生体関連分子」という用語は、被検対象物を認識し得るプローブ分子、つまり、互いに親和性を有する物質の一方を選択的に検出し得る分子認識能を有するものを意味し、反応領域を形成する部材表面に固相化される。従って、基板上に固相化されて互いに親和性を有する物質の一方を選択的に検出し得る分子認識能を有する限り、何れの物質をも含む概念であり、cDNA、PCR産物等のDNA断片、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、ペプチド核酸等の核酸、タンパク質、ペプチド、糖、細胞、微生物等、が好ましく例示されるが、これらに限定されるものではない。

生体関連物質は、市販品を利用することができ、細胞、組織等から適当な抽出、精製手段を用いて得られたものを、また、人工的に合成されたものを利用することもできる。生体関連物質として核酸を用いる場合には、公知の方法を用いて細胞もしくは組織より抽出されたDNA、RNAを利用することができ、更には、鎖状若しくは環状のプラスミドDNAや染色体DNA、これらを制限酵素により若しくは化学的に切断したDNA断片、試験管内で酵素等により合成されたDNA、又は化学合成したオリゴヌクレオチド等を用いることもできる。また、タンパク質、ペプチドの場合は、細胞若しくは組織等から抽出、精製されたタンパク質、タンパク質をプロテアーゼ等により酵素的若しくは化学的に切断

したペプチド断片、組み換え遺伝子技術を用いて合成されたタンパク質、抗体、酵素等を用いることができる。ここで、物質識別能とは、互いに親和性を有する物質を選択的に識別しえることを意味し、例えば、DNA-DNA、DNA-RNA、RNA-RNAの塩基間でのハイブリダイゼーション(相補的結合)能、抗体、抗体フラグメント-抗原間、または、調節因子、受容体-ホルモン、サイトカイン、神経伝達物質、レクチン等

間、または、酵素-基質、補酵素等間の生体応答能が、好ましく例示される。したがって、本発明のマイクロアレイは、DNAチップ、プロテインチップ、糖鎖チップ、ウイルスチップ、微生物チップ、細胞チップ等として、構成することが可能であり、核酸の配列情報の決定、遺伝子の発現や変異、多様性などの解析、および目的タンパク質の精製、同定、タンパク質の発現、相互作用、翻訳後修飾等の機能解析に好ましく、利用可能である。

[0056] また、標的物質は、生体関連物質によって捕獲される物質、つまり、部材に担持された生体関連物質と、先に示したような選択的に識別可能な親和性を有して相互作用する物質である。例えば、cDNA、PCR産物等のDNA断片、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、ペプチド核酸等の核酸、タンパク質、ペプチド、糖、細胞、微生物等、が好ましく例示されるが、これらに限定されるものではない。

[0057] バイオチップに供せられる被検試料は、環境もしくは生体中に存在する標的物質の存在が疑われる試料の何れをも含む概念である。土壌、水等の環境試料、生体試料、食品試料等を例示することができ、これらは、好ましくは、適当な前処理が施され、また、このましくは、適当な標識で標識される。例えば、標的物質が核酸の場合は、上記試料から微生物、動物もしくは、植物の細胞もしくは組織を抽出、精製もしくは単離し、得られた細胞もしくは組織から適当な手段により核酸試料を調製することが好ましい。細胞、組織からの調製は、通常の核酸の調製方法に基づいて行われる。mRNAの場合は、標識dNTPの存在下での逆転写反応により、標識cDNAとすることが好ましく、また、原核細胞では、トータルRNAを抽出することが、また、遺伝子の変異や多型を調べる際には、標識プライマー、若しくは標識dNTPの存在下で標的領域をPCRにより増幅しておくことが好ましい。更に、基板上のDNA断片がオリゴヌクレオチドである場合には、標的核酸は低分子化しておくことが好ましい。

[0058] [2] バイオチップの微細構造

本発明の「バイオチップの微細構造」に係る構成を以下に示す。

[0059] 本発明の特徴構成は、互いに当接させる第1部材と第2部材との間に生体関連分子を担持する反応領域を備えた生体関連分子バイオチップであって、前記第1部材および前記第2部材の少なくとも何れか一方がポリジメチルシロキサン(PDMS)で構

成してあり、前記PDMSの基材中に気体分子を侵入させてある点にある。

[0060] 本発明者らは光学的特性および微細加工材料として優れた特性を有するPDMSのバイオチップ用基板としての好適な利用に関して鋭意研究した結果、真空条件下で気体と接触させてPDMS基材の網目構造間隙に気体分子を侵入させることにより、大気圧下においてもその基板内部に気体分子を保持でき、PDMS基材自体の気体透過性を改質できることを見出し、かかる知見を基礎として本発明を完成するに至った。

[0061] 従って、本構成であれば、反応領域となる微細チャンバー内の水分の保持が可能となるバイオチップとすることができることから、高精度かつ、再現性高い検出が可能となり、長期保存が可能となる。つまり、溶液の状態として長期間保存することができるようになり、DNAだけでなく、タンパク質などの生体成分を自由にチップ化することが可能となり、その応用範囲は広範に渡る。特に、取り扱いの難しいタンパク質の活性、構造維持が可能となることから、プロテインチップとしての使用が期待され、プロテオーム技術の発展に大きく貢献するものである。

[0062] また、本発明の特徴構成は、前記ポリジメチルシロキサンで構成された部材の表面にコーティングを施してある点にある。

[0063] 本構成であれば、PDMS基材の気体遮断性が更に高められ、PDMS基材により一部もしくは全部が囲まれて形成される反応空間の気密性が更に高められる。

[0064] また、本発明の特徴構成は、前記コーティングがガス不透過性ポリマーである点にある。

[0065] 本構成であれば、不透過性ポリマーによってPDMS基材内部に貯留された気体分子をPDMS基材から散逸することを確実に防止できるため、PDMS基材の気体遮断性がより一層高められ、PDMS基材により一部もしくは全部が囲まれて形成される反応空間の気密性が更に高められる。

[0066] また、本発明の特徴構成は、互いに当接させる第1部材および第2部材の少なくとも何れか一方をポリジメチルシロキサンで構成し、前記第1部材と前記第2部材との間に形成した反応領域に生体関連分子を担持する生体関連分子バイオチップの製造

方法であって、前記ポリジメチルシロキサンで構成した部材を真空条件下に維持する工程と、当該真空雰囲気中に所定の気体を供給して、前記ポリジメチルシロキサンの基材中に前記気体の分子を侵入させる工程とを有する点にある。

[0067] 本構成であれば、反応領域となる微細チャンバー内の水分の保持が可能となるバイオチップを製造することができる。本構成により製造されたバイオチップにより、高精度かつ、再現性高い検出が可能となり、長期保存が可能となる。つまり、溶液の状態として長期間保存することができるようになり、DNAだけでなく、タンパク質などの生体成分を自由にチップ化することが可能となり、その応用範囲は広範に渡る。特に、取り扱いの難しいタンパク質の活性、構造維持が可能となることから、プロテインチップとしての使用が期待され、プロテオーム技術の発展に大きく貢献するものである。

[0068] [3]バイオチップの表面改質

本発明の「バイオチップの表面改質」に関する構成を以下に示す。

[0069] 本発明の特徴構成は、シリコン樹脂表面にオゾンに接触させるオゾン接触工程を行った後、前記シリコン樹脂表面に還元剤に接触させる還元剤接触工程を行うシリコン樹脂の表面改質方法とした点にある。

[0070] 本構成であれば、シリコン樹脂表面にオゾンに接触させたとき、特に不飽和結合を有するシリコン樹脂表面に作用したオゾンにより、分子鎖を切断することなくオゾニドが形成される。分子鎖が切断されないことで、シリコン樹脂表面にひび割れが発生して白濁することがないため、樹脂の透明性が維持される。

そして、このようにオゾニドが形成されているシリコン樹脂表面に還元剤に接触させる。これにより、不安定なオゾニドを効率よく安定な水酸基やカルボキシル基に変換し、その結果、シリコン樹脂表面を親水化する改質ができる。このようにシリコン樹脂表面を親水化し、その後、例えば、アミノシランやポリ-L-リシン等のカップリング剤を結合させる等の処理を行うことにより、シリコン樹脂と生体関連分子や各種化学物質との親和性を増大させることが可能となる。このように、シリコン樹脂を親水化する改質が可能となれば、表面活性の高いシリコン樹脂への改質が容易に行える。

従って、生体関連分子や各種化学物質をシリコン樹脂表面上に固定し易くなり、シリコ

ン樹脂上での生化学反応をより確実に行える。

また、本構成であると高価なプラズマ照射装置等を用いる必要が無いため、コストパフォーマンスに優れたバイオチップを提供できる。

[0071] また、本発明の特徴構成は、前記還元剤接触工程を行った後、前記シリコン樹脂表面に表面機能修飾剤を接触させる表面機能修飾剤接触工程を行う点にある。

[0072] 本構成であれば、シリコン樹脂表面に生成した水酸基やカルボキシル基と、例えばアミノ基含有表面機能修飾剤とを反応させると、シリコン樹脂表面に、アミノ基等、種々の官能基を導入することができる。そのため、種々の表面機能修飾剤を使用することにより、多種類の生体関連分子や各種化学物質と親和性を有するシリコン樹脂を製造できる。従って、適用範囲の広いバイオチップの構成材料を提供することができる。

[0073] また、本発明の特徴構成は、前記シリコン樹脂が、ポリジメチルシロキサン(PDMS)を主成分とする点にある。

[0074] 本構成であれば、シリコン樹脂として、透明性・光学的特性・鋳型に対する追従性・加工容易性・密着性等の物理的に優れた特性を有するPDMSを好適に利用することができる。PDMSは安価に入手が容易であり、かつ、加工に要する手間を省力化できる。このため、コストパフォーマンスに優れたバイオチップ等を製造でき、ディスプレイ系を構築し易くなってコンタミネーションに関する問題も生じ難い。

[0075] また、本発明の特徴構成は、前記還元剤が過酸化水素である点にある。

[0076] 本構成であれば、入手及び取り扱いが容易な還元剤として過酸化水素を利用できるため、シリコン樹脂表面の親水化を容易に行える。

[0077] また、本発明の特徴構成は、前記表面機能修飾剤がシランカップリング剤である点にある。

[0078] 本構成であれば、入手及び取り扱いが容易な表面機能修飾剤としてシランカップリング剤を利用できるため、シリコン樹脂表面に対して、アミノ基やフェニル基等の生体関連分子と親和性の高い官能基の付与を容易に行える。

[0079] また、本発明の特徴構成は、前記オゾン接触工程において、前記樹脂表面に対してオゾンを、0.8g/h以上で1〜3時間処理する点にある。

[0080] 後述の実施例にも示したが、本構成の条件でオゾン接触工程を行うことにより、表面活性化処理後も、シリコン樹脂 (PDMS) は透明性を維持するという結果が得られている。従って、本構成であれば、短時間でオゾン接触工程を行うことができるため、コストパフォーマンスや効率面で優れたシリコン樹脂の表面改質方法となる。

[0081] [4] バイオチップの温度調節

本発明の「バイオチップの温度調節」に係る構成を以下に示す。

[0082] 本発明の特徴構成は、流体流路と、前記流体流路と接続した反応領域とを設けたバイオチップの温度を調節する温度調節部を設けたバイオチップ反应用温度調節器において、

前記温度調節部が、前記バイオチップを載置する伝熱ブロックと、前記伝熱ブロックと接するペルチェ素子と、前記ペルチェ素子と接する加熱吸熱手段とを順に配設してある点にある。

[0083] ここで、加熱吸熱手段は、対象物であるペルチェ素子を加熱、或いは、ペルチェ素子の熱を吸熱自在に構成可能である。

[0084] 一般に、ペルチェ素子は、p型半導体とn型半導体とを熱的に並列に配置し、電氣的に直列に接続して通電することにより、放熱面と吸熱面とができる。そのため、ペルチェ素子と接する伝熱ブロックは、例えば、ペルチェ素子の正常駆動により加熱され、或いは、ペルチェ素子の逆駆動により冷却されるように構成することができる。

[0085] このとき、ペルチェ素子の正常駆動時には、ペルチェ素子の放熱側と伝熱ブロックとが接するため、伝熱ブロックを介してバイオチップを加熱することができる。さらに、本構成であれば、ペルチェ素子と接する加熱吸熱手段は、ペルチェ素子を加熱するように構成可能であるため、ペルチェ素子を迅速に昇温することができる。

[0086] つまり、加熱吸熱手段によるペルチェ素子の加熱により、ペルチェ素子の温度とバイオチップの所望の温度との温度差をペルチェ素子単独である場合と比べて迅速に小さくすることができる。そのため、バイオチップを加熱する際の加熱効率が向上することになる。

[0087] ペルチェ素子の逆駆動時には、ペルチェ素子の吸熱側と伝熱ブロックとが接するため、ペルチェ素子は伝熱ブロックを介してバイオチップを冷却することができる。この

とき、本構成であれば、ペルチェ素子と接する加熱吸熱手段は、ペルチェ素子の熱を吸熱するように構成可能である。その結果、ペルチェ素子を迅速に降温することができる。

[0088] 従って、本構成であれば、ペルチェ素子単独である場合と比べてバイオチップの温度制御を迅速に行うことができる。その結果、バイオチップにおける各種工程の処理時間を大幅に短縮することができる。

[0089] また、本発明の特徴構成は、前記加熱吸熱手段と接するヒータを設けてある点にある。

[0090] 本構成であれば、加熱吸熱手段と接するヒータを設けてあるため、ヒータによって容易に加熱吸熱手段の温度を制御することができる。

[0091] また、本発明の特徴構成は、反応領域を設けたバイオチップの温度を調節する温度調節部を設けたバイオチップ反応用温度調節器において、

前記バイオチップが、反応液を注入する注入孔と、前記反応液を反応させる反応領域と、前記反応液を排出する排出孔と、前記注入孔と前記反応領域とを連通させる第一流路と、前記反応領域と前記排出孔とを連通させる第二流路とを基板上に付設して構成してあるとき、

前記温度調節部を複数設けて、少なくとも前記第一流路の一部と前記第二流路の一部とを含む領域を冷却自在に構成し、少なくとも前記反応領域を含む領域を加熱或いは冷却自在に構成してある点にある。

[0092] このように構成すると、少なくとも1つの温度調節部により反応領域を加熱或いは冷却自在となり、反応領域では、例えば、ハイブリダイゼーション及びその後の洗浄を実行するための温度をそれぞれ設定することができる。

そして、第一流路の一部と第二流路の一部とを含んでいる領域を少なくとも1つの温度調節部により冷却できるため、反応領域の加熱により反応液から発生した水蒸気は、第一流路或いは第二流路で結露し易くなる。そのため、反応領域に存在する反応液は、バイオチップの外部へと蒸発して散逸し難くなる。

[0093] 従って、本構成であれば、微量の試薬等のサンプルを扱うバイオチップ上での実験において、サンプルの蒸発による散逸を防ぐことができるため、実験工程を確実に遂

行できる。

発明を実施するための最良の形態

[0094] 以下、本発明の実施の形態を添付した図面に基づき詳細に説明する。しかしながら、本発明は、以下に例示する実施の形態に限定されるものではなく、適当な改変形態も本発明に含まれることは理解できよう。

[0095] [第1実施形態]

本実施形態はバイオチップの形状に関し、微細加工技術を用いて、試料を担持させる反応領域を線形状の空間として複数並列的に配置して構成することにより、試料間の干渉を防止した高精度な検出を実現できるバイオチップに関して説明する。以下、反応領域となる空間の配置形状から、本構成のバイオチップをバーコードアレイと称する。

[0096] <実施形態1-1>

図1は、本発明のバーコードアレイの上面図であり、本発明の基本的構成を示す概略図である。図2は、図1のA-A線断面図であり、実施形態1-1として構成された場合における本発明のバーコードアレイを模式的に図示する。以下、図2における上側を「上方」、と、下側を「下方」というものとする。

[0097] 図1および図2に示す通り、本発明のバーコードアレイは、第1部材1と第1部材1の上面に固定配置された第2部材2から構成されており、第1部材1と第2部材2との間には、バーコード形状に配置された反応領域3となる空間が設けられている。

[0098] 第1部材1は平坦な板状体として構成されている。第2部材2は平坦な板状の基材に表面処理が施され、その第1部材1との接触面に、複数の一方向に延伸する溝6がバーコード形状に並列形成されている。つまり、第2部材2は、その第1部材との接触面側に、複数の線形状の溝6と、該各溝6を区画する隔壁7が交互に並列する空間構造を有している。各溝6は、互いに略平行に配置されることが好ましい。また、図2においては、溝6の断面形状は、溝6の底部が平坦な四角形であるが、これに限定されるものではなく、底部に向かって狭くなる逆三角形や台形等、任意の形状に形成してもよい。

[0099] そして、第2部材2に形成された各隔壁7の下端面は、第1部材1と緊密に接着され

ている。このように構成することにより、第2部材2に形成された各溝6の開口は封止され、隔壁7と第1部材1により完全に隔てられた線形形状の反応領域3となる空間が形成される。これにより、反応領域3から外部、つまり、隣接する反応領域3に流体が散逸するのを確実に防止することができることから、隣接する反応領域3間での試料のコンタミネーションを確実に防止することが可能となる。

[0100] 第1部材1と第2部材2を構成する基材としては、例えば、ガラス板、石英板、シリコンウェハーなどが好ましく例示されるが、従来用いられる何れの公知の材料をも用いることができる。特に、成形容易性および光学的特性の観点から、光学的観点から、ポリジメチルシロキサン(PDMS)、アクリル樹脂のポリメタクリル酸メチル(poly methyl methacrylate、PMMA、ポリメチルメタクリレート)が好ましく例示される。また、第1部材1と第2部材2を同一の基材を用いて形成することができ、また、異なる基材を用いて形成することもできる。第1部材1、第2部材2の形状、大きさ、厚さ等、いずれも、特に、制限はないが、形状は板状体であることが特に好ましい。また、部材の大きさは、反応領域3の数、大きさ、形状等に応じて適宜決定され、一例として、26×76mmが挙げられるが、これに限定されるものではない。また、第1部材1、第2部材2の厚さは、部材を構成する基材の種類、部材に要求される形状の安定性、設けられる反応領域3の数、大きさ、形状等に応じて適宜決定されるものとし、第1部材1と第2部材2の適合性をも考慮して決定される。

[0101] PDMSは、シリコンエラストマーの一種であり、透明性・光学的特性に優れており、広い波長領域、特に、可視光領域での吸収が極めて小さく、蛍光検出にもほとんど影響しないため、PDMSをバイオチップ基板として用いることにより、S/N値を低くできる。

また、鋳型に対する追従性が高く、任意の微細構造に成形しやすいという特性を有している点で、各種光学機器に最適な形にバイオチップを微細加工できるという利点がある。

さらに、PDMSはそれ自体、ガラス、アクリル樹脂などと密着性がよい性質を有しており、微細加工を施されたPDMS基材に平坦なガラス、アクリル樹脂部材を当接させることにより、接着剤等での接着等の接着手段を用いなくとも流路や、チャンバーを

形成することが可能となる。

尚、本明細書では、PDMSを主成分とする樹脂基材をPDMS基材と称する。本明細書では、「主成分」とは、樹脂成分中に50%以上、好ましくは70%以上含まれる成分を指し、適宜、他の物質を含んでもよい。そのため、PDMSが主成分となる範囲で、前記重合剤の他に種々の添加剤を添加することが可能である。

[0102] 反応領域3の形状は線形状の空間であり、バーコード形状に、第1部材1と第2部材2の間に複数並列形成されている。反応領域3は、生体関連分子の固相化領域として、基板に固相化される生体関連分子、試料、反応溶液の注入、キャピラリー現象によるこれらの拡散のための流路として、生体高分子をガラスPDMS等の基板に結合させる反応に用いるべく構成される。

[0103] また、ハイブリダイゼーション、抗原抗体応答反応等の実施領域として、さらには、生体関連分子等を固相化した状態で保存する際にはチャンバーとしての役割を有するべく構成されている。

[0104] この他に、ハイブリダイゼーション、抗原抗体応答反応等の実施は、反応領域3に生体関連分子を固相化した後、アレイを構成する二つの部材の内のいずれか一方（例えば、構成部材がガラスと線形状に加工したPDMS基材である場合には、PDMS基材）を剥がし、生体関連分子を固相化した領域全体をカバーできる別の部材（例えば、PDMS基材チャンバー）で覆い、ハイブリダイゼーション、抗原抗体応答反応等を、このチャンバー内で同時に行うように構成することも可能である。このように構成することにより、アレイ全体を一つの反応槽中で反応させることが可能となることから、煩雑な処理を経なくとも、線形状に形成された各反応領域3を同一の試料で均等に接触させることが可能となる。

[0105] 反応領域3の長さ、幅、奥行き、および反応領域3間の間隔等、いずれも、特に制限はなく、生体関連分子、反応液、試料等を充分かつ均等に展開し、反応に良好な反応液を保持でき、所望の反応を実施できる空間を確保できれば、適宜設計されるものである。反応領域3の幅は、10–200 μm とすることが好ましく例示されるが、これに限定されるものではない。また、反応領域3の幅や間隔をバーコードのように変えて判定情報を読み取れるように構成することも可能である。

- [0106] そして、図1に示す通り、反応領域3と外部を連通可能とする、試料供給口4と試料回収口5を設けた構成とすることができる。試料供給口4は、適切な試料供給手段と接続され反応領域3内に試料を供給する開口であり、試料回収口5は、適切な試料回収手段と接続され反応領域3外に試料を回収、排出する開口である。試料供給口4と試料回収口5は、かかる機能を有し、反応領域3内における所望の反応を妨害するものではない限り、その形状、大きさ、設定位置等、特に制限はなく、適宜設計され得る。したがって、図1においては、第2部材2の反応領域3の長手方向の一端に試料供給口4を設け、また、他端に試料回収口5を設けた構成が開示されているが、これに限定されるものではなく、試料供給口4と試料回収口5とが一つの開口を共有するべく構成することも可能であり、また、第2部材2の反応領域3の真上、または、側方向に、また、第1部材1に形成することも可能である。
- [0107] 適切な試料供給手段、試料回収手段としては、ガラス製シリンジ、プラスチックシリンジ、マイクロピペッター、フッ化エチレン樹脂チューブ・シリコンチューブ、塩ビチューブ、ペリスタポンプ、プランジャーポンプ、シリンジポンプ等が、もしくは、これらを組み合わせが、好ましく例示される。これらの材質は、核酸、タンパク質等の試料中の物質を非特異的に吸着しないものであることが好ましい。
- [0108] 次に、本発明の第1の実施の形態のバーコードアレイの製造方法について説明する。まず、部材表面に微細加工を施す、つまり、第2部材2の第1部材1との接触面に溝6構造を形成する。基板表面に溝を形成する方法は、公知の微細加工技術のいずれの方法をも使用することができる。直接的に形成する方法として、微細加工用ドリル、ブロード等を用いて機械的切削加工法により溝部分を取り除く方法、フォトリソグラフィ、電子ビームリソグラフィ等の電離放射線リソグラフィまたはAFMリソグラフィ、物理的、化学的エッチングにより、溝部分を取り除く方法等、あるいは、これらの方法を組み合わせて用いることが例示される。更に、上記で説明した方法に準じて作製した、所望の溝構造に反転する凸部構造を有する鋳型を用いて該空間構造を転写することにより、間接的に溝を形成することも可能であり、例えば、鋳型を用いた射出成形、もしくは高温でのプレスモールド等を用いることができる。

- [0109] 微細構造が施される部材を構成する基材としてPDMS基材を用いる場合には、PDMS基材は鋳型に対する追従性が高いので、鋳型を用いて形成する方法が特に好ましく利用できる。鋳型を用いることにより、一旦、鋳型を作製すると、簡便かつ安価に大量のチップを生産できるため、製造コスト削減することができる。
- [0110] 次に、微細加工を施された第2部材2の隔壁7(凸部)の上端面と、第1部材1を接着させることにより、溝6の開口を封止する。第1部材1と第2部材2は、好ましくは緊密に接着されるものとし、これにより、反応領域間での試料のコンタミネーションを確実に防止することが可能となる。接着方法は、接着剤を塗布することにより接着可能であるが、PDMS基材はそれ自身、ガラス、アクリル樹脂などの平面に密着するという性質を有することから、一方の部材にPDMS基材を用いた場合において、他方の部材として例えば平らなガラスを用いる場合、ガラス用洗剤(セミコクリーン(フルウチ化学製)等、または0.3N水酸化ナトリウム溶液等)で有機物、ゴミなどを取り除けば接着剤なしで接着することが可能となる。また、プラズマエッチング装置を用いて表面を酸素で処理するとより強固な接着が可能となる。
- [0111] 次に、特に、好ましい形態として、鋳型法を用いたPDMSチップの具体的な作成手順について簡単に説明する。鋳型の形成は、公知の微細加工技術を何れをも使用することができ、フォトリソグラフィ技術とエッチング技術を組合わせて利用することが、好ましく例示される。フォトリソグラフィ加工は、シリコンやガラス等の加工する基板上にフォトレジスト(感光性樹脂)を塗布し、熱処理後、所望の流路パターンを形成したフォトマスクを通してレジストを露光し、レジスト層を熱処理した後、所定の現像液で現像することにより行われる。フォトレジストは、露光した部分が現像させるポジ型と、露光されない部分が現像されるネガ型の双方を使用することができ、スピンコート、ロールコート、ディップコート等、公知の手段により、基板上に均一に塗布される。現像液は、レジストの種類に応じて適宜選択され、ポジ型レジストには、水酸化テトラメチルアンモニウム水溶液が、ネガ型レジストは、キシレン/アセトン混合液が好ましく、使用される。
- [0112] 次に、好ましくは、上記フォトリソグラフィ処理された基板を、エッチング加工する。エッチングは、硫酸、硝酸、リン酸、フッ酸などの薬液中で行われるウェットエッチング

、トリフルオロメタン、テトラフルオロメタン、又は、ヘキサフルオロエタン等を含む、反応性ガスを放電させてプラズマ状態にし、この時発生するラジカル(反応種)とイオンを固体材料と反応させて反応生成物として取り除き、微細パターンを形成するプラズマエッチングに代表される、ドライエッチングの何れをも使用することができるが、溝構造を転写する部材の鋳型からの離型の容易化を図れるとの観点から、エッチングの一方で、CF、CF₂ラジカル等が基板に付着して離型を容易にする保護膜を形成するプラズマエッチングが特に、好ましく例示される。

[0113] 続いて、上記のようにして作製された凹凸形状の空間構造をもつ鋳型を型枠内に固定化し、未架橋のPDMSを適当な重合剤を混合して型に流し込み、硬化させることで、鋳型構造をPDMSに転写する。硬化後、鋳型から剥離することにより、所望の構造の形状パターンを有するPDMS基材が作製できる。硬化温度は、好ましくは、23℃〜150℃であり、硬化温度に応じて、硬化時間を設定するものとし、23℃にて24時間、65℃にて4時間、75℃にて2時間30分間、100℃にて1時間、150℃にて15分間が例示され、好ましくは、75℃にて2時間30分間で行うものとする。

[0114] 次に、本発明の第1の実施の形態のバーコードアレイを用いた標的物質の検出方法について例示的に説明する。まず、反応領域3に、標的物質に対して物質識別能を有する生体関連分子を担持する。生体関連分子は反応領域3となる空間を囲む第1部材1、第2部材2表面に固相化される。第1部材1表面、第2部材2表面の何れかのみに固相化すること、また、双方に固相化すること何れも可能である。また、固相化は、第1部材1と第2部材2を接着させた後に行うこともできるが、これらを接着する前に行うことも可能であり、適宜、選択されるものである。部材の接着後に生体関連物質の固相化を行う場合は、生体関連物質を含有する試料を、試料注入口から注入することにより行われる。

[0115] 部材表面に生体関連分子を固相化する方法は、公知の何れの方法を利用することができ、固相化される物質の種類や部材を構成する基材の種類に応じて、適宜最適な方法が選択される。例えば、固相化される生体関連分子が核酸の場合は、静電結合、共有結合が、また、タンパク質の場合は、共有結合法、イオン結合法、物理的吸着法、あるいは、生物学的特異結合等の担体結合法、架橋法、高分子物質で包み

込む包括法(格子型あるいはマイクロカプセル型)が好ましく利用される。核酸に関して、具体的方法としては、DNAの荷電を利用してポリリジン、ポリエチレンジイミン等のポリ陽イオンで担体表面に静電結合させる方法、アミノ基、アルデヒド基、エポキシ基等を有する各種シランカップリング剤で表面処理された担体に、末端に官能基としてアミノ基、アルデヒド基、SH基、ビオチン等が導入されたDNAとを共有結合させる方法等を好ましく例示することができる。その後、必要に応じて、紫外線照射、化学架橋剤によるクロスリンク形成、表面のブロッキング、洗浄等の処理を行うものとする。ここで、固相化とは、生体関連分子が本来の活性を損なうことなく、基板表面から実質的に脱離しないことを意味する。

[0116] 次に、標的物質を捕獲するための反応を実施する。試料供給口4から、適当な前処理を行った被検試料溶液、ハイブリダイゼーション溶液等の反応溶液、洗浄液等を、反応領域3内に供給し、所定の反応後、試料回収口5を介して、反応領域3から、回収、排出する。

[0117] また、ハイブリダイゼーション、抗原抗体応答反応等の実施は、反応領域3に生体関連分子を固相化した後、アレイを構成する二つの部材の内のいずれか一方(例えば、構成部材がガラスと線形状に加工しPDMS基材である場合には、PDMS基材)を剥がし、生体関連分子を固相化した領域全体をカバーできる別の部材(例えば、PDMS基材チャンバー)で覆い、ハイブリダイゼーション、抗原抗体応答反応等を、このチャンバー内で同時に行うように構成することも可能である。このように構成することにより、アレイ全体を一つの反応槽中で反応させることが可能となることから、煩雑な処理を経なくとも、線形状に形成された各反応領域3を同一の試料で均等に接触させることが可能となる。

[0118] 反応後、マイクロアレイ上の生体関連分子と相互作用した被検試料中の標的物質を、例えば、標識物質を指標として検出する。検出手段は、好ましくは、バーコードリーダーのようなラインセンサーが例示される。安価なラインセンサーでデータの読み取りが可能であることから、検出コストの軽減を図ることができる。また、ラインセンサーで読み取る際には、反応領域上を走査する限り、反応領域に直交する方向、もしくは、斜交する方向等、いずれの方向から読み取ることが可能であるため、マイクロ

キャナーを利用する場合のような厳密な位置決めが不要であるため操作を簡便化することが可能となる。

[0119] ここで、本発明の第1の実施の形態においては、第2部材2に溝6を形成した形態を例示的に説明したが、第1部材1に溝6を形成した逆形態も、好ましく本実施の形態として、例示される。

[0120] <実施の形態1-2>

次に、図3をもって、本発明の実施の形態1-2のバーコードアレイについて、説明する。図3は、図1のA-A線断面図であり、実施の形態1-2として構成された場合における本発明のバーコードアレイを図示する。実施の形態1-1のバーコードアレイと同一の構成については、図中、同一の符号をもって、説明を省略する。

[0121] 第1部材1および第2部材2は共に、平坦な板状の基材に表面処理が施され、その他方の部材との接触面に、複数の一方向に延伸する溝6がバーコード形状に並列形成されている。つまり、第1部材1と第2部材2とは共に、その第1部材1との接触面側に、複数の線形状の溝6と、該各溝6を区画する隔壁7とが交互に並列する空間構造を有している。そして、第1部材1と第2部材2とを当接させた時に、第1部材1に形成された溝6と、第2部材2に形成された溝6とが、夫々、一対一に対向するように構成されている。

[0122] そして、第1部材1に形成された各隔壁7の上端面と第2部材2に形成された各隔壁7の下端面とは緊密に接着されている。このように構成することにより、第1部材に第2部材に形成された各溝6の開口が1つの空間を形成し、隔壁7、第1部材および第2部材により完全に隔てられた線形状の反応領域3となる空間が形成される。

[0123] <実施の形態1-3>

次に、図4をもって、本発明の実施の形態1-3のバーコードアレイについて説明する。図4は、図1のA-A線断面図であり、実施の形態1-3として構成された場合における本発明のバーコードアレイを模式的に図示する。第1の実施の形態のバーコードアレイと同一の構成については、図中、同一の符号をもって説明を省略する。

[0124] 第1部材1は、平坦な板状の基材に表面処理が施され、第2部材2との接触面に、複数の一方向に延伸する線形凸部8がバーコード形状に並列形成されている。そし

て、第2部材2も、平坦な板状の基材に表面処理が施され、第1部材1との接触面に前記線形凸部8と一対一に嵌合可能な複数の線形溝部10を並列形成されている。つまり、第1部材1は、その第2部材2との接触面側に、複数の線形凸部8と、該線形凸部8を区画する凹部9

とが交互に並列する空間構造を有し、第2部材2は、その第1部材1との接触面側に、複数の線形溝部10と、該各溝部10を区画する隔壁7とが交互に並列する空間構造を有している。そして、前記線形凸部8と前記線形溝部10とを嵌合させつつ、前記第1部材1と前記第2部材2とを当接させたとき、前記線形凸部8と前記線形溝部8との間に反応領域3となる空間が形成されるように構成している。

[0125] そして、第1部材1に形成された各凹部9と第2部材2に形成された隔壁7とが緊密に嵌合接着されている。このように構成することにより、前記線形凸部8と前記線形溝部10との間に反応領域3となる線形形状の空間が形成され、該空間は、隔壁7、第1部材1および第2部材2により外部から完全に隔てられる。このように、基板表面において、反応領域と反応領域以外の領域との間に高低差を設けておき、反応領域表面に検出の焦点をあわせることにより、バックグラウンドからのノイズ検出量を低減させることが可能となり、S/N値を向上させることが可能となる。

[0126] 第1部材1に形成される線形凸部8の高さ、形状等、および、第2部材2に形成される線形溝部10の高さ、形状は、前記線形凸部8と前記線形溝部10とを嵌合させつつ、前記第1部材1と前記第2部材2とを当接させたとき、前記線形凸部8と前記線形溝部10との間に反応領域3となる空間が形成されるよう構成される限り、適宜設定されるものではあるが、線形凸部8の高さは、好ましくは、 $1\mu\text{m}$ 〜 1cm に形成され、特に好ましくは、 $10\mu\text{m}$ 〜 1mm である。

[0127] ここで、本発明の実施の形態1-3として、第1部材1に線形凸部8を、第2部材2に線形溝10を形成する形態を例示的に説明したが、第1部材1に線形溝10を、第2部材2に線形凸部8を形成する逆形態も好ましい本実施の形態として例示される。

[0128] <他の実施形態>

以下に、第1実施形態における他の実施形態に関して説明する。

(1)本発明の生体関連分子マイクロアレイの構成として、一方もしくは双方に微細加

工を施した二つの部材を接着させ、その間に形成された反応領域内に生体関連分子を担持させるものについて説明したが、微細加工を施した一の部材のみで構成したものを採用してもよい。つまり、一の部材を造溝加工して、複数の線状の溝を並列形成し、この線状溝を反応領域として生体関連分子を担持させて反応を行うものでもよい。加工される部材としては、成形容易性および光学的特性の観点から、ポリジメチルシロキサン、もしくは、ポリメタクリル酸メチルなど透明シリコンゴムあるいはプラスチック樹脂等が例示される。

このように構成することにより、閉鎖系領域だけでなく、開放系領域においても、ハイブリダイゼーション等の反応を実施することができると共に、成形容易、かつ、光学的特性にも優れた生体関連分子マイクロアレイを提供することができる。

(2)次に、一の部材を穴あけ加工して、複数の線状の孔を並列形成し、この線状孔を反応領域として生体関連分子を担持させて反応を行うものでもよく、加工される部材としては、成形容易性および光学的特性の観点から、ポリジメチルシロキサン、もしくは、ポリメタクリル酸メチルなど透明シリコンゴムあるいはプラスチック樹脂等が例示される。

[0129] <実施例1>

以下、第1実施形態を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

[0130] PDMSチップの作製

(1) 鋳型の作製

シリコンウェハー(径4インチ、信越化学製)表面を過酸化水素硫酸(過酸化水素：硫酸＝1：2)で、続いてバッファードフッ酸で洗浄し、洗浄後、ウェハーを蒸留水ですす

ぎ、乾燥した。次に、ウェハー上にネガ型エポキシ系硬膜レジストSU-8(Micro

Chem社製)をスピncerを用いてスピncerコートした。スピncerコートの条件を、以下に示す。

[0131] スピncerコート条件(1例、流路高100 μ mの場合)

slope 5秒→500rpm 5秒→slope 10秒→2800rpm 30秒→slope 5秒 ス

ピンコート後、最低1時間以上、静置した後、ウェハを65℃にて10分間、および、それに続く、95℃にて30分間、熱処理を行った。

[0132] 次に、ウェハの上に所望の流路パターンに反転する凸部パターンが得られるフォトマスクをのせ、露光装置上で45秒間(流路高100 μ mの場合)、紫外線照射することにより、露光した。ここで、露光時間は、所望の流路高を得るべく、調製されるものである。露光後、ウェハを65℃にて3分間および、それに続く、95℃にて10分間、熱処理を行った。ウェハをSU-8現像液(メルク社)に入れ、15分間振とうしながらレジスト層を現像することにより、未重合のSU-8を除去した。

[0133] 次に、2-プロパノールで10分間振とうしながらウェハを洗浄し、続いて、蒸留水で洗浄後、ウェハを乾燥した。乾燥後、プラズマエッチング装置にてウェハ表面をトリフルオロメタン(CHF_3)で処理した。所望の流路構造に反転した凸部が構築された鋳型を得、以下に示すPDMS基材の微細加工用の鋳型として用いた。

[0134] (2) 鋳型からの転写

Sylgard(登録商標)184(Dow Corning社製)とキュア剤(Dow Corning社製)を製造業者の指示に従い、重量比10:1の割合で測り取り、混合した。24mm×76mm×2mm寸法のものを作るのに約5g必要となり、形成する基板の寸法に応じて、適量測り取った。

[0135] 次に、この混合液をデシケーター内で脱気し、脱気後、ウェハをセットした型に脱気済PDMSを流し込んだ。そして、75℃のオーブンで2時間半加熱することによって、硬化させた。硬化したPDMSを鋳型から剥離することにより、鋳型の凸部が転写された溝を備えたPDMSチップを作製した。

[0136] (発明の効果)

本発明のバーコードアレイによれば、線状形空間に区画成形された反応領域に試料を流し込むことから、隣接する反応領域による干渉を防止できると共に、ターゲットDNAの非特異的な基板上への吸着を防止でき、ノイズを低減できることから、高精度な検出が可能となる。

[0137] 更に、基板表面において、反応領域と、反応領域以外の領域との間に、高低差を設けることにより、バックグラウンド蛍光等を低減させることが可能となり、S/N値を向

上させることが可能となる。

- [0138] また、高価なマイクロアレイスキャナーを用いずとも、汎用のラインセンサーで、検出が可能となり、コスト削減が可能となると共に、マイクロアレイスキャナーのような正確位置決めがなくとも検出が可能であることから、操作の簡便化を図ることが可能となる。

光学的特性に優れたPDMSを基板を構成する基材として使用することにより、低バックグラウンドを達成でき、高いS/N比により検出が可能となる共に、成形容易性にも優れていることから、ナノ、ミクロンオーダーでの加工が容易となり、各種光学的機器に最適な形に製造が可能となり、鋳型を用いた成形方法を採用することにより、大量生産を可能とし、更なるコスト削減効果が期待できる。

また、本機器は前処理のみ、各々の試料に適した方法を用いることにより、何れの試料にも適用可能であるため、環境試料中に含まれる微生物、食品の遺伝子検査、医療分野における遺伝子診断、テーラーメイド医療などへの応用が期待され、バイオ機器の発展に貢献する。

- [0139] また、本発明の生体関連分子マイクロアレイによれば、閉鎖系領域だけでなく、開放系領域での反応が可能となる。

[0140] [第2実施形態]

本実施形態はバイオチップの微細構造に関し、互いに当接させる第1部材と第2部材との間に生体関連分子を担持する反応領域を備えた生体関連分子バイオチップであって、前記第1部材および前記第2部材の少なくとも何れか一方がPDMSで構成しており、前記PDMS基材中に気体分子を侵入させてある。基材の網目構造の隙間内に気体分子を侵入させることにより、網目構造隙間に気体分子が充填、保持されて、PDMS基材自体の有する気体透過性を改質させることができる。

- [0141] 互いに当接させる第1部材と第2部材との間に生体関連分子を担持する反応領域を備えた生体関連分子バイオチップとは、第1部材と第2部材とを互いに当接することにより、第1部材と第2部材の間に空間が形成されるべく構成されるものであり、その空間にプローブ分子として生体関連分子が担持されるバイオチップを意味するものである。そして、該空間は反応領域として機能するものである。ここで、反応領域とは

、例えば、生体関連分子が担持される領域、つまり、生体関連分子の固相化領域として、基板に固相化される生体関連分子、試料、反応溶液の注入、キャピラリー現象によるこれらの拡散のための流路として、ハイブリダイゼーション、抗体抗原応答反応等の実施領域、また、生体関連分子等を固相化した状態で保存する際にはチャンバーとしての役割を有するべく構成されるものである。第1部材と第2部材は、プローブ分子をスポットする基盤とカバープレートとして、また、微細加工を施されたプローブのスポット部を形成する構造体として、構成されることが、好ましく例示される。

[0142] 第1部材、第2部材の、少なくとも一方はPDMSで構成される。つまり、第1部材、第2部材の一方がPDMSで構成される限り、他方の部材を構成する基材には制限はなく、公知の何れの基材により構成されてもよいことを意味する。したがって、双方の部材をPDMSで構成してもよく、また、他方の部材をPDMS以外の基材で構成してもよい。他方の部材をPDMS以外の基材で構成する場合には、ガラス、アクリル樹脂等のPDMSとの密着性の高い部材が好ましく例示される。

[0143] 前記PDMSの基材中に気体分子を侵入させてあるとは、PDMS基材の網目構造の隙間に気体分子が保持されることを意味し、つまり、侵入した気体分子の基材内部から放出が抑制され、PDMS基材の網目構造間隙が気体分子により充填されることを指す。このように構成することにより、PDMS基材自体の気体遮断性が向上し、PDMSによって一部または全部が囲まれる反応領域となる空間の気密性を向上させることが可能となる。したがって、反応領域内部からの水分の蒸発を防止することができ、良好な反応環境、保存環境を提供することができ、水分の蒸発によるハイブリダイゼーション等の反応系への影響を軽減できる。特に、第1部材、第2部材を構成する基材が、PDMS-PDMS、ガラス、アクリル樹脂等のPDMSとの密着性の高い基材として構成された場合には、これらの部材同士の密着性の高さとも相俟って、反応領域からの水分の蒸発を最小限に抑制できる。

[0144] 気体分子としては、PDMS基材の網目構造中には、ほとんどの気体を保持することが可能であるため、生体関連分子と標的物質の選択的応答反応に影響を与えない限り、いずれの気体をも使用することができるが、取り扱いの簡便さの面から、好ましくは、窒素

、アルゴン等の不活性ガス分子、水分子が例示され、特に、好ましくは、水分子である。

[0145] 更に、PDMS基材をコーティング処理することが可能である。コーティング処理は、PDMS基材内部に貯留された気体分子をPDMS基材から散逸することを防止するために行われるものである。これにより、PDMS基材の気体遮断性が更に高められ、PDMS基材により一部もしくは全部が囲まれて形成される反応空間の気密性が更に高められる。コーティング処理に用いられるコーティング剤は、反応領域に担持される生体関連分子の活性に影響を与えない限り、公知の何れのコーティング剤をも使用することができる。また、コーティングを施す時期に関しても特に制限はなく、気体分子を侵入させた後、また、気体分子を侵入させる前、何れの時期においても行うことができる。気体分子をPDMS基材に侵入された後にコーティング処理を施す場合には、一部コーティング処理を施さない部位を形成する、もしくは、基材全体をコーティング処理した後に基材内部に気体が侵入できるように任意の部位に穴を形成する等、の処理を行うことにより、これら未コーティングの部位から気体を基板内に侵入させることが好適に利用できる。

[0146] また、上記処理されたPDMS基材により構成される部材は、好ましくは、親水性処理される。親水性処理は、公知の親水性表面処理方法が何れをも好ましく使用することにより行われるが、特に、好ましくは、 O_2 プラズマ処理(例えば、Macromolecules 26, 5870(1993)等を参照。)、紫外線／オゾン処理(例えば、Journal of colloid and Interface Science 254, 306-315(2000)等を参照。)等により親水性表面処理される。これにより、疎水性であったPDMS基材表面が親水性となり、ポリ-L-リシン等のアミノ基やカルボキシル基に富んだ各種機能性高分子をコーティングすることが可能となる。さらにこのアミノ基やカルボキシル基にDNA、タンパク質等生体関連分子を結合させることができる。また各種の色素を効率よく沈着することができ、例えば、酵素標識した標的DNAなどを用いた上で酵素の基質を反応させて、色素を発生させ、可視光で目的遺伝子の検出が可能となる。また、親水処理を施す時期に関しても特に制限はなく、気体分子を侵入させた後、また、気体分子を侵入させる前、何れの時期においても行うことができる。

- [0147] 次に、本発明のマイクロアレイの製造方法について説明する。本発明のマイクロアレイの製造方法は、PDMSで構成した基材を真空条件下に維持する工程（以下、「真空維持工程」と略する。）と、真空雰囲気中に所定の気体を供給して、PDMS基材内部に前記気体の分子を侵入させる（以下、「気体侵入工程」と略する。）とを有する。真空雰囲気中で、所定の気体を供給することにより、網目構造の表面孔から気体分子が、基材の内部全域に渡り均一に侵入し、大気圧下に戻された際にも、気体分子の基材内部からの放出が抑制され、基材内部に気体分子が保持され得る、つまり、PDMS基材の網目構造間隙が気体分子により充填された状態に保たれる。
- [0148] 真空維持工程は、PDMSで構成した基材を密閉空間に収容し、該密閉空間を真空引きすることにより、真空条件下に維持する。密閉空間の真空引きは、密閉空間の上面側、下面側、又は、側面側の何れか、または、これらの複数の面の組み合わせからの真空引きにより、行ってもよい。ここで、真空条件とは大気圧より低い圧力の気体で満たされた空間内の状態を意味し、真空度は、特に制限はなく、気体分子侵入工程において供給される気体の種類、基材の大きさ等を勘案しながら、適宜決定される。
- [0149] 気体分子侵入工程は、真空雰囲気が確立された密閉空間内に、所定の気体を供給して、PDMS基材の網目構造内に気体分子を侵入させ、保持させるものである。供給される気体は、特に制限はないが、取り扱いの簡便さおよび安全性の面から、好ましくは、水蒸気、窒素ガスまたはアルゴン等の不活性ガスであり、特に好ましくは、水蒸気である。気体分子の供給は、密閉空間の上面側、下面側、又は、側面側の何れか、または、これらの複数の面の組み合わせからの供給により、行ってもよい。また、供給される気体の温度、圧力等、また、気体との曝露時間等に関しても、特に制限はなく、真空維持工程により形成される真空度、部材の大きさ等を勘案して、適宜決定される。
- [0150] 真空維持工程と気体分子侵入工程を行うタイミングは、特に制限はなく、PDMSにより構成される基材が、真空雰囲気中で気体分子と接触させることが可能であれば、気体分子の供給を開始した後に、該密閉空間の真空引きを停止してもよいし、また、気体分子の供給と、該密閉空間の真空引きを並列的に行うように構成してもよい。ま

た、これらの処理は、第1部材と第2部材を当接する前に予め行った後、2つの部材を当接させてもよく、また、第1部材と第2部材を当接させた後に行ってもよい。

[0151] 気体侵入工程において水蒸気を供給する場合に用いられる水蒸気は、好ましくは、飽和水蒸気若しくは、飽和水蒸気に更に熱を加えて100℃以上の高温に熱した加熱水蒸気であり、また、水蒸気の温度、圧力、曝露時間等は、特に限定されないが、なるべく多くの水蒸気をジメチルシロキサンの網目構造中に保持させるために、高温であることが好ましく、具体的には、50℃以上で処理することが好ましいが、これに限定するものではない。

[0152] 真空維持工程、気体分子侵入工程の後、該密閉空間内を外部に開放して大気圧下にもどす。気体侵入工程終了後、即、大気を密閉空間内に導入して大気圧下に戻してもよく、また、終了後、しばらく放置した後、導入してもよく、適宜、設定される。

[0153] 次に、本発明を実施するための装置の一例について説明する。PDMSで構成された基材を収納する密閉性の反応槽と、前記反応槽に、反応槽内の内圧を調節する内圧調節手段と、反応槽内に気体を供給する気体供給手段と、反応槽内部の圧力を検出する圧力センサー等を設けた構成とすることができる。更に、各部の作動を制御する制御手段を設けることも可能である。内圧調節手段は、反応槽内の空気を排気して前記反応槽内部を真空雰囲気とする真空ポンプと、反応槽内に空気を送気する送気ポンプまたは外気に反応槽内の雰囲気を開放するバルブを有するものとして構成することができ、また、気体供給手段としては、供給する気体が水蒸気である場合には、熱水を入れた容器、バーナによる浄水の加熱、蒸気式ボイラー等として構成することができる。

[0154] <実施例1>

PDMS基材をアルカリ洗浄済のスライドガラスに貼り付け、PDMS基材とスライドガラスの間には、2つの部材によって包囲された試料を担持できる反応領域となる空間（本実施例では、チャンバーとして構成）が形成された実験チップを作製した。作製した実験チップを水蒸気で満たした真空雰囲気が形成されたデシケーター内に20分間静置した。

[0155] 次に、前記空間と外部を連通する試料供給用の小孔から前記実験チップに形成さ

れた空間内に、シリンジポンプを用いて流速 $4\mu\text{L}/\text{分}$ にて 0.025% プロモフェノールブルー水溶液を $8\mu\text{L}$ 注入した後、 60°C のヒートブロック上で加熱し、加熱後、0、10分、30分後に、実験チップの写真撮影を行い、実験チップの該チャンバー内に残留するプロモフェノールブルー／蒸留水の量の変化を観察した。結果を図5に示す。実験チップの該チャンバー内に残留するプロモフェノールブルー／蒸留水の量の変化により、前記チャンバーの気密性、つまり、前記チャンバー内からの水分の蒸発について分析するものである。また、所定時間経過後にチャンバー内に残存しているプロモフェノールブルー水溶液の量を測量し、注入量($8\mu\text{L}$)を 100% とした残存量の割合を算出し、表1にまとめた。

[0156] <実施例2>

真空下での水蒸気処理に先立って予め、チップ表面にラップを貼り付けたことを除いて、実施例1と同様に実験チップを作製し、実施例1と同様に処理してチャンバー内からの水分の蒸発について分析した。結果を図5および、表1に示す。

[0157] <比較例1>

真空下での水蒸気処理を行わず、そのまま、 60°C のヒートブロック上においたことを除いて実施例1と同様に実験チップを作製し、実施例1と同様に処理してチャンバー内からの水分の蒸発について分析した。結果を図5および表1に示す。

[0158] [表1]

チップ調整方法	加熱開始からの経過時間		
	0分	10分	30分
比較例 1	100	80	50
実施例 1	100	95	80
実施例 2	100	100	100

数値は一定時間経過後
残っている水の割合(%)

[0159] 図5においてチャンバー内の色が濃い部分は、プロモフェノールブルー水溶液が残留している部分である。例えば、比較例1では、加熱後、0、10分、30分後と経過

するに従い、チャンバー内の色が薄くなっていることが判る。

図5および、上記表1の結果から明らかなように、真空条件下で水蒸気処理を行った実験チップのチャンバー内の水は、未処理のものに比べて明らかに保持されることが判明した(実施例1と比較例1の比較。)。したがって、真空条件下での水蒸気処理によりPDMS基材自体の気体遮断性が向上することで、PDMS基材で形成されたチャンバー内の気密性が向上し、チャンバー内部からの水の蒸発を防止できることが理解できる。

また、PDMS基材表面にコーティングを施すことにより、その効果が更に向上していることが判明した(実施例1と実施例2の比較。)

[0160] (発明の効果)

本発明の生物関連分子マイクロアレイによれば、反応領域となる微細チャンバー内の水分の保持が可能となることから、高精度かつ、再現性高い検出が可能となり、長期保存が可能となる。つまり、溶液の状態として長期間保存することができるようになり、DNAだけでなく、タンパク質などの生体成分を自由にチップ化することが可能となり、その応用範囲は広範に渡る。特に、取り扱いの難しいタンパク質の活性、構造維持が可能となることから、プロテインチップとしての使用が期待され、プロテオーム技術の発展に大きく貢献するものである。

[0161] PDMS基材表面を親水処理することにより、可視光での検出が可能となることから、安価なLEDランプ、CCDカメラでの検出が可能となり、低コスト化を図ることができる。

[0162] 以上のように優れた特性を有する本発明のマイクロアレイは、環境分野、食品、医療分野での実用化が期待でき、バイオ機器の技術発展に貢献するものである。

[0163] [第3実施形態]

本実施形態はバイオチップの表面改質に関し、特にバイオチップの構成材料であるシリコン樹脂の表面改質方法であり、図6に示したように、シリコン樹脂表面にオゾンを接触させるオゾン接触工程を行った後、シリコン樹脂表面に還元剤を接触させる還元剤接触工程を行うことを特徴とする。

[0164] シリコン樹脂は、一般にシリコンゴムと呼ばれる有機珪素ポリマーであり、シロキサン

結合で構成される主鎖に結合する側鎖によりいくつかの種類がある。最も一般的なシリコン樹脂は、トリメチルシロキシを末端基とするポリジメチルシロキサン (PDMS) である。ポリジメチルシロキサンの特性は、シリコン原子と結合したメチル基を、水素・アルキル・フェニル又は有機官能基で置換することによって種々変更することができる。

このPDMSは、安価に入手可能であり、透明性・光学的特性・鑄型に対する追従性、加工容易性・密着性等の物理的に優れた特性を有するため、生化学反応を行うバイオチップの素材として適している。尚、シリコン樹脂は、PDMSに限られるものではない。

[0165] PDMSの主成分はジメチルシロキサンであるが、これだけでは重合は起こらず、側鎖にビニル基等を持つシロキサン化合物が入ることによって所々で架橋が起こり、網目構造を形成する。そして、例えばビニル基を含んだ重合剤により重合されると、分子鎖内に不飽和結合が形成されるため、後述するように、このPDMS基材の表面に作用したオゾンにより、分子鎖を切断することなくオゾニドを形成し易くなる。尚、上述したように、PDMSを主成分とする樹脂基材をPDMS基材と称する。

[0166] 上記シリコン樹脂表面は、通常、生体関連分子との親和性に乏しい。そのため、バイオチップ上で生化学反応を好適に行うべく、表面特性の改質を行う。

[0167] まず、シリコン樹脂表面にオゾンを接触させるオゾン接触工程を行う。このとき、特に不飽和結合を有するシリコン樹脂表面に作用したオゾンにより、分子鎖を切断することなくオゾニドが形成される。分子鎖が切断されないことで、シリコン樹脂表面にひび割れが発生して白濁することがないため、樹脂の透明性が維持される。そして、オゾニドが形成されているシリコン樹脂表面に還元剤を接触させる還元剤接触工程を行った場合、不安定なオゾニドを効率よく安定な水酸基やカルボキシル基に変換し、シリコン樹脂表面を親水化する改質ができる。このようにシリコン樹脂表面を親水化する改質により、表面活性の高いシリコン樹脂に改質できる。従って、生体関連分子や各種化学物質をシリコン樹脂表面上に固定し易くなる。

[0168] 還元剤は、過酸化水素が好適に例示されるがこれに限られるものではない。その他の還元剤としては、例えば、硫化ナトリウム等が使用できる。

[0169] 還元剤接触工程を行った後、シリコン樹脂表面に表面機能修飾剤を接触させる表

面機能修飾剤接触工程を行う。

この工程では、シリコン樹脂表面に生成した水酸基やカルボキシル基と、アミノ基やフェニル基を含有した表面機能修飾剤とを反応させ、シリコン樹脂表面に、アミノ基やフェニル基等、種々の官能基を導入することができる。そのため、多種類の生体関連分子や各種化学物質と親和性を有するシリコン樹脂を製造することが可能となる。

[0170] 表面機能修飾剤は、各種シランカップリング剤が好適に例示されるがこれに限られるものではない。シランカップリング剤は、例えば、アミノ基を導入する場合は3-アミノ

プロピルトリエトキシシラン等のアミノシランを、フェニル基を導入する場合は、フェニルトリエトキシシラン (PTES) 等のフェニルシランを、それぞれ使用できる。シランカップリング剤以外の表面機能修飾剤としては、例えば、ポリ-L-リシン等が好適に使用できる。

[0171] <実施例>

以下に、本発明の実施例を図面に基づいて詳細に説明する。

(バイオチップ)

生体関連分子の一例であるDNAを固定するバイオチップは、種々の形態が適用できる。

例えば、図7に、基板(第1部材)38上にPDMS (Sylgard(登録商標)184、(Dow Corning社製))を主成分として形成してあるPDMS基材(第2部材)39を付設してあるDNAチップ31を示す。このPDMS基材39は、主成分であるPDMSの他に、後述する重合剤と添加剤とを成分として含んでいる。

PDMS基材39には、微小な毛細管状の流体流路36、37を形成する溝、これら流路と接続する反応領域としての反応チャンバ34a、34bを形成する凹部、反応液を注入する注入孔33、反応液(反応済液)を排出する排出孔35等が微細加工してある。

つまり、基板38とPDMS基材39との間には、2つの部材によって包囲されることにより、試料が流通する空間(流体流路36、37)、及び、試料を担持できる反応領域となる空間(反応チャンバ34)が形成される。

基板38は、ガラスプレート等の固相担体等が適用できる。他に、固相担体としては

、石英板、シリコンウェハーなどが好ましく例示される。

[0172] そして、微細加工を施されたPDMS基材39と基板38とを緊密に接着させる。接着方法は、接着剤を塗布することにより接着可能であるが、PDMSはそれ自身、ガラス、アクリル樹脂などの平面に密着するという性質を有することから、一方の部材にPDMS基材を用い、他方の部材として例えば平らなガラスを用いる場合、ガラス用アルカリ洗剤等で有機物、ゴミなどを取り除けば接着剤なしで接着することが可能となる。

[0173] また、バイオチップは上述した構成に限らず、PDMS基材に微細加工を施して、バーコード状に並列配置された反応空間を有するDNAチップとすることも可能である。

この場合、第1部材、第2部材共に平坦な板状体として構成され、第2部材は、その第1部材との接触面に、複数の一方向に延伸する溝がバーコード形状に並列形成される構成とする。

[0174] 尚、微細構造が施される部材を構成する基材としてPDMSを用いる場合には、PDMSは鋳型に対する追従性が高いので、鋳型を用いて形成する方法が特に好ましい。一旦鋳型を作製すると、簡便かつ安価に大量のチップを生産できるため、製造コストを削減することができる。鋳型の形成は、フォトリソグラフィ技術とエッチング技術を組合わせて行う等、公知の微細加工技術を適宜用いて行う。

このようにして作製された凹凸形状の空間構造をもつ鋳型を型枠内に固定化し、未架橋のPDMSを適当な重合剤及び添加剤と混合して型に流し込み、熱を加えて硬化させることで、鋳型構造をPDMSに転写する。このとき、硬化温度に応じて硬化時間を適宜設定する。硬化後、鋳型から剥離することにより、所望の構造の形状パターンを有するPDMS基板が作製できる。

本実施例では、重合剤としては、メチルヒドロジェンシロキサン(methylhydrogen siloxane)を使用してある。このとき、PDMS:重合剤=10:1程度の割合で混合するのが好ましい。

また、添加剤としては、3-アクリロキシプロピルトリメトキシシラン(KBM-5103)等のメキシ基を含有した粘着剤を0.1〜2%になるように混合してある。これにより、PDMS基材に対するDNAの固定効率が向上することが期待できる。

[0175] (PDMS基材表面改質)

上記PDMS基材39の表面を活性化させる実験を行った。

PDMS基材39の表面活性化は、例えば、図7に示したDNAチップ31の場合、少なくとも、反応チャンバ34表面、つまり、基板38とPDMS基材39とを接着させたときに基板38と対面するPDMS基材39の凹部表面に施す。流体流路36, 37表面にも、適宜、表面活性化を施すことが可能であるが、流体流路36, 37を単なる流体(試薬)の通路として捉えた場合、生体関連分子や各種化学物質との親和性が低い方が好ましい場合があるため、必ず表面活性化を施す必要は無い。

- [0176] 尚、「生体関連分子」とは、cDNA・PCR産物等のDNA断片、オリゴヌクレオチド・ポリヌクレオチド・ペプチド核酸等の核酸、タンパク質、ペプチド、糖、細胞、微生物等、が好ましく例示されるが、これらに限定されるものではない。
- [0177] 以下に、PDMS基材表面を活性化させる処理を詳述する。尚、以下の実験に用いたPDMS基材は、流体流路や反応チャンバを形成する溝や凹部を設けない平板状の部材とした。
- [0178] このPDMS基材をオゾンに接触させる(オゾン接触工程)。PDMS基材に対するオゾンの接触は、オゾナイザ(ED-OG-R4:エコデザイン社製)により、放電管電圧75 V、オゾン濃度0.8g/h(流量2L/分)で、1〜3時間の条件で行った。
- オゾン接触工程の後、PDMS基材を30%過酸化水素水に10分間或いは24時間浸漬した(還元剤接触工程)。
- [0179] その後、シランカップリング剤として3-アミノプロピルトリエトキシシランを含む50%エタノール溶液に、PDMS基材を10分間或いは24時間浸漬した(表面機能修飾剤接触工程)。シランカップリング剤は、pHを7.0又は4.5に調整したものを用いた。また、シランカップリング剤は、室温又は75℃に加温して行った。
- [0180] その後、100%エタノールにPDMS基材を浸漬し、2分間攪拌する処理を2回繰り返すことにより、PDMS基材表面を洗浄する洗浄工程を行った。洗浄後、40℃、15分間の乾燥工程を行った。
- [0181] このように、オゾン接触工程・還元剤接触工程および表面機能修飾剤接触工程において、処理時間・温度条件等を種々変更して処理した基板サンプル1〜7を作製した。

サンプル1〜7を作製したときの実験条件を、表2に示した。

[0182] [表2]

	オゾン 接触工程	還元剤 接触工程	表面機能修飾剤 接触工程
1	1時間	10分間浸漬	10分間浸漬 (pH 7.0、室温)
2	1時間	10分間浸漬	24時間浸漬 (pH 7.0、室温)
3	1時間	10分間浸漬	24時間浸漬 (pH 7.0、室温)
4	1時間	24時間浸漬	10分間浸漬 (pH 7.0、室温)
5	1時間	10分間浸漬	10分間浸漬 (pH 4.5、室温)
6	3時間	10分間浸漬	10分間浸漬 (pH 4.5、室温)
7	3時間	10分間浸漬	10分間浸漬 (pH 4.5、75℃)

[0183] このとき、サンプル1〜7の表面所見としては、全てのサンプルにおいて、透明性が維持されていると認められた。そのため、オゾン接触工程は、コストや効率等の観点から、1〜3時間程度行うのが好ましいと考えられる。

[0184] (表面改質したPDMSと生体関連分子との親和性)

表面改質処理を行ったPDMS基材39表面にDNAを固定し、生体関連分子であるDNAとの親和性の強度を調べた。

サンプル1の条件で表面改質したPDMS基材へのDNAの固定は、以下のように行った。

定法によりフルオレセインイソチオシアネート(FITC)で蛍光標識した1pmol/ μ LのオリゴDNA溶液をPDMS基材の表面に塗布(スポット)し、120mJでUV照射して蛍光標識DNAを表面改質PDMS基材の表面に固定した。その後、純水で洗浄して固定していないDNAを除去し、40℃・20分間の乾燥を行った。

[0185] このように蛍光標識DNAを固定したPDMS基材を、DNAマイクロアレイ専用スキャナーにて蛍光強度を吸光波長550nm、励起波長570nmにて測定し、画像処理を行った。画像処理の結果を図8(c)に示す。尚、図8(a)の画像は、本発明のオゾン処理工程を行わない比較データ1、図8(b)の画像は、前記添加剤を混合してあるPDMS基材に本発明のオゾン処理工程を行わない比較データ2である。平均値を取るためにDNAのスポットは8点(スポット1〜8)作成している。そして、画像処理した後のスポットが濃くなればDNAが効率よく固定化されていることを示している。

[0186] PDMS基材表面に固定されたDNA濃度の測定結果(表3)と、表面所見等による各サンプルの評価は以下のとおりである。

尚、DNAの濃度は、蛍光強度との標準曲線から計算した(参考:DNA濃度=(蛍光強度+3451.9)/134647)。また、蛍光強度は、8つのデータの平均値からバックグラウンドを引いた値である。表3のスポット1〜8は、図8の各画像データにおいて、左上から左下を順にスポット1〜4、右上から右下を順にスポット5〜8とする。

[0187] [表3]

スポット	比較データ 1	比較データ 2	オゾン処理実行
1	7 4 1	1 7 7 7 6	9 9 3 9 9
2	4 2 9	2 1 6 6 3	5 3 4 3 1
3	5 3 3	2 2 0 3 8	9 9 8 2 2
4	1 2 7 7	2 4 2 0 8	9 9 9 7 8
5	3 8 6	2 4 7 8 3	6 7 9 5 8
6	5 1 9	2 5 6 6 4	4 6 1 1 6
7	6 6 2	3 1 0 1 3	8 5 2 0 9
8	1 6 6 5	3 0 3 3 3	9 9 1 9 4
バックグラウンド	2 5 9	1 5 5 8	4 1 2 3
蛍光強度	5 1 8	2 3 1 2 6	7 7 2 6 5
DNA濃度 (p m o l)	0. 0 3	0. 2 0	0. 6 0

[0188] PDMS基材に添加剤を混合せず、オゾン処理もしない比較データ1(図8(a))においては、殆どDNAを固定できないことが明らかである。PDMS基材に添加剤を混合した比較データ2(図8(b))においては、僅かにDNAの結合能が見られる。一方、添加剤を混合し、オゾン処理を行った本発明の方法を適用したデータ(図8(c))においては、濃いスポットが検出されたため、高効率でDNAが固定化されているものと認められた。尚、何れの場合もPDMS基材の透明性は損なわれていない。

[0189] 以上より、本発明のオゾン処理工程を行うことにより、PDMS基材はDNAとの親和性が向上し、DNA固定能力が向上するように改質できたため、好適に分析が行えるバイオチップの基板素材を提供できると認められた。

[0190] <別実施の形態>

上述した実施例において、PDMSを主成分とするシリコン樹脂を例示したが、これ

に限るものではない。例えば、アクリル樹脂のポリメタクリル酸メチル(poly methyl methacrylate、PMMA、ポリメチルメタクリレート)においても実施可能である。

[0191] [第4実施形態]

本実施形態はバイオチップの温度調節に関し、特に、バイオチップの温度を調節するバイオチップ反応用温度調節器について詳述する。

[0192] マイクロリアクターは、例えば、基材中に、サンプル注入孔やサンプル排出孔、微小な毛細管状の流体流路、或いは、この流路と接続する反応領域としての反応槽等の構造が形成された微小分析デバイスのことであり、DNA分析デバイス・微小電気泳動デバイス・微小クロマトグラフィーデバイス・微小センサー等として使用される。本実施例では、バイオチップの一例として、DNA分析デバイスの一種であるDNAチップを例示する。

[0193] DNAチップは、検体中の標的核酸とハイブリダイズさせるためのDNAプローブを基板に固定したものを例示するが、これに限られるものではない。

つまり、本発明のバイオチップ反応用温度調節器は、DNAチップの温度を調節する温度調節装置として適用することが可能である。

[0194] 図9～10に示したように、バイオチップ反応用温度調節器Xは、温度調節対象物であるDNAチップ(マイクロリアクター)31を載置する伝熱ブロック23と、伝熱ブロック23と接するペルチェ素子24と、ペルチェ素子24と接する加熱吸熱手段26とを順に配設して構成してある。

[0195] また、加熱吸熱手段26と接するヒータ25を設けて構成してある。

尚、図9では、冷却ファン27及び排気ダクト28を含めた構成を示してある。一方、図10では、後述するように、DNAチップ31において、第一所定部Aを冷却自在に、第二所定部Bを加熱或いは冷却自在に構成するとき、温度調節部を複数設けて第一所定部A及び第二所定部Bがそれぞれ別個の温度調節部32a、32b上に設けられるように構成する場合の要部概略図を示してある。

[0196] 本実施例では、ペルチェ素子24は、例えば、銅にハンダメッキして構成してある電極間に、ビスマス材料で作られた熱電半導体チップを挟んで板状に構成してある。そして、このようにして形成してある板状のペルチェ素子24を、通電自在に構成する。

- [0197] 加熱吸熱手段26は、加熱或いは吸熱対象物であるペルチェ素子24を加熱、或いは、ペルチェ素子24の熱を吸熱自在に構成可能であり、例えば、ラテラル伝導に優れたグラファイト等で構成してある。そのため、ヒータ25と接する加熱吸熱手段26は、ヒータ25の熱を効率よくペルチェ素子24に伝熱してペルチェ素子24を加熱することができる。また、ヒータ25が駆動しない場合は、ペルチェ素子24が保持する熱を、加熱吸熱手段26を介して、例えば排気ダクト28側に放熱することによりペルチェ素子24の熱を吸熱することができる。その結果、ペルチェ素子24を迅速に降温することができる。
- [0198] 当該ヒータ25は、例えば、セラミックヒータ(熱容量100〜150W)等を使用することが可能である。伝熱ブロック23には熱電対29が埋め込んである。
- [0199] DNAチップ31は、図7に示したように、検体中の標的核酸を含んだ反応液を注入する注入孔33と、DNAプローブと検体中の標的核酸とをハイブリダイズさせる反応領域34と、ハイブリダイズ後の反応液(反応済液)を排出する排出孔35と、注入孔33と反応領域34とを連通させる第一流路36、及び、反応領域34と排出孔35とを連通させる第二流路37とを基板38上に付設してある。
- [0200] 検体中の標的核酸は、例えば、PCR増幅反応液に含まれる増幅済みの核酸等が該当するが、これに限られるものではない。
- [0201] 基板38は、ガラスプレート等の固相担体等が適用できる。他に、固相担体としては、石英板、シリコンウェハなどが好ましく例示される。
- 注入孔33、第一流路36、反応領域34、第二流路37、及び、排出孔35は、微細加工が可能な弾性部材39により区画可能な構成とするのが好ましい。
- 弾性部材39は、例えば、成形容易性および光学的特性の観点から、ポリジメチルシロキサン(PDMS)等が適用可能である。
- 上述したようにPDMSは、透明性・光学的特性に優れ、可視光領域での吸収が極めて小さく、蛍光検出にもほとんど影響しないため、PDMSをバイオチップ基板として用いることにより、S/N値を低くできる。さらに、鋳型追従性に優れ、微細加工が容易であるという特性を有している。
- [0202] さらに、PDMSはそれ自体、ガラス、アクリル樹脂などと密着性がよい性質を有して

おり、微細加工を施されたPDMS基材に平坦なガラス、アクリル樹脂部材を当接させることにより、接着剤等での接着等の接着手段を用いなくとも流路や、チャンバーを形成することが可能となる。

つまり、本構成のように、注入孔33、第一流路36、反応領域34、第二流路37、及び、排出孔35がナノからミクロンオーダーでの微細加工が可能な弾性部材39 (PDMS)により区画可能な構成とすると、DNAチップ31上に、注入孔33、第一流路36、反応領域34a、第二流路37、及び、排出孔35を容易に施工できるため、効率よくDNAチップ31を作製することができる。

- [0203] 一般に、ペルチェ素子24は、p型半導体とn型半導体とを熱的に並列に配置し、電氣的に直列に接続して通電することにより、放熱面と吸熱面とができる。そのため、ペルチェ素子24と接する伝熱ブロック23は、ペルチェ素子24の正常駆動により加熱され、或いは、ペルチェ素子24の逆駆動により冷却されるように構成することができる。
- [0204] このように構成すると、ペルチェ素子24の正常駆動時には、ペルチェ素子24の放熱側と伝熱ブロック23とが接するため、伝熱ブロック23を介してDNAチップ31を加熱することができる。このとき、セラミックヒータ25を駆動させれば、加熱吸熱手段26はセラミックヒータ25の熱を効率よくペルチェ素子24に伝熱してペルチェ素子24を加熱することができるため、ペルチェ素子24を迅速に昇温することができる。
- [0205] ここで、ペルチェ素子24と温度調節対象物であるDNAチップ31との温度について、室温でバイオチップ反应用温度調節器Xを駆動する場合を例示する。
- [0206] 電源オフ時等の駆動前は、バイオチップ反应用温度調節器X(ペルチェ素子24)は室温と略同じ温度を有している。そして、駆動直後に例えば94℃まで昇温するものとする。このとき、バイオチップ反应用温度調節器X(ペルチェ素子24)の温度とDNAチップ31の所望の温度との温度差は、室温ー94℃の温度差となる。つまり、バイオチップ反应用温度調節器Xにより室温から94℃まで昇温させる必要がある。
- [0207] ここで、ペルチェ素子24に適当な電流を通電して発熱させ、さらに、セラミックヒータ25を発熱させて加熱吸熱手段26を介してペルチェ素子24を加熱すると、ペルチェ素子24の温度とDNAチップ31の所望の温度(94℃)との温度差を、ペルチェ素子24単独である場合と比べて迅速に小さくすることができる。そのため、DNAチップ31

を加熱する際の加熱効率が向上することになる。

- [0208] 尚、ペルチェ素子24の加熱特性を効率よく発揮できるように、セラミックヒータ25の加熱温度を適宜設定することが可能である。
- [0209] 従って、本構成のバイオチップ反応用温度調節器Xを適用すると、ペルチェ素子単独である場合と比べてDNAチップ31を迅速に昇温することができるため、各種工程の処理時間を大幅に短縮することができる。
- [0210] さらに、ペルチェ素子24の逆駆動時には、ペルチェ素子24の吸熱側と伝熱ブロック23とが接するため、ペルチェ素子24は伝熱ブロック23を介してDNAチップ31を冷却することができる。このとき、セラミックヒータ25の駆動を停止すると、ペルチェ素子24が保持する熱を、加熱吸熱手段26を介して例えば排気ダクト28側に放熱することによりペルチェ素子の熱を吸熱することができる。その結果、ペルチェ素子を迅速に降温することができる。このとき、冷却ファン27を用いることにより、放熱効果の向上が期待できる。
- [0211] 尚、ペルチェ素子24、伝熱ブロック23及び加熱吸熱手段26の材料及び寸法を、ペルチェ素子24の加熱特性を効率よく発揮できるように適宜設定するのが好ましい。
- [0212] 図7に示したように、上述したDNAチップ31は、少なくとも第一流路36の一部と第二流路37の一部とを含む領域を第一所定部Aとし、少なくとも反応領域34を含む領域を第二所定部Bとし、第一所定部Aを冷却自在に、第二所定部Bを加熱或いは冷却自在に構成することが可能である。
- [0213] 例えば、第一所定部Aは、注入孔33から第一流路36の途中まで、及び、第二流路37の途中から排出孔35までを含んだ領域とし、さらに、第二所定部Bは、反応領域34を含んだ領域とする。ここで、図7に示したように、反応領域34を2つのチャンバー(第1チャンバー34a及び第2チャンバー34b)とすることが可能である。このとき、例えば、第1チャンバー34aでハイブリダイズを行い、第2チャンバー34bで試薬等の溶液を一時貯溜する、或いは、一時貯溜した試薬等の溶液を攪拌する等、それぞれのチャンバーで別々の機能を持たせることが可能となる。
- [0214] 第一所定部A及び第二所定部Bは、図7および10に示したように、それぞれ別個の

温度調節部32a、32b上に設けられるように構成する。例えば、第一所定部Aは、温度調節部32a(伝熱ブロック23'、ペルチェ素子24'、加熱吸熱手段26')で温度調節し、第二所定部Bは、温度調節部32b(伝熱ブロック23、ペルチェ素子24、セラミックヒータ25、加熱吸熱手段26で温度調節するように構成する(図10参照)。温度調節部32aでは、必要に応じてセラミックヒータ25を付加することが可能である。また、第一所定部Aと第二所定部Bとは、それぞれ、伝熱ブロックとペルチェ素子とで構成するようにしてもよい。

そして、第一所定部A及び第二所定部Bがお互いの温度調節の影響を受けるのを防止するため断熱材40を設け、さらに、DNAチップ31の第一所定部A及び第二所定部Bをそれぞれ温度調節部32a、32b上に正確に位置付けるため、位置決めピン44及びホルダー45を設けるのが好ましい。

[0215] 第二所定部Bを加熱或いは冷却自在としているため、反応領域34を含んでいる第二所定部Bでは、ハイブリダイゼーション及びその後の洗浄を実行するための温度設定をすることができる。

[0216] そして、第一流路36及び第二流路37の一部を含んでいる第一所定部Aを冷却することができるため、例えば、反応領域34の加熱により試薬等から発生した水蒸気は、第一流路36或いは第二流路37で結露し易くなる。そのため、反応領域34に存在する試薬等は、DNAチップ31の外部へと蒸発して散逸し難くなる。

[0217] 従って、反応領域34内のサンプルが減少し難くなり、微量のサンプルを扱うDNAチップ31上での実験を確実に遂行することが可能となる。

[0218] 尚、一枚のDNAチップ31上に、第一所定部A及び第二所定部Bをそれぞれ複数設ける構成とすることが可能である。

産業上の利用可能性

[0219] 本発明のバイオチップは、核酸の配列情報の決定、遺伝子の発現・変異・多様性などの解析、および、目的タンパク質の精製・同定、タンパク質の発現・相互作用・翻訳後修飾等の機能解析に利用することが可能である。

図面の簡単な説明

[0220] [図1]本発明のバーコードアレイの上面図であって、本発明の基本的構成を示す概

略図

[図2]図1のA-A線断面図であり、第1の実施の形態として構成された場合における本発明のバーコードアレイを図示する模式図

[図3]図1のA-A線断面図であり、第2の実施の形態として構成された場合における本発明のバーコードアレイを図示する模式図

[図4]図1のA-A線断面図であり、第3の実施の形態として構成された場合における本発明のバーコードアレイを図示する模式図

[図5]実施例1、実施例2、および比較例1で作製された実験チップの水分保持性を比較した実験結果を示す図

[図6]本発明のシリコン樹脂の表面改質方法の工程を示した図

[図7]バイオチップの一例を示した図

[図8]PDMS基材表面に蛍光標識DNAを固定し、蛍光強度を測定した結果を示した図

[図9]本発明のバイオチップ反応用温度調節器の概略図

[図10]複数の温度調節部を設けたバイオチップ反応用温度調節器の概略図

符号の説明

- [0221] 1 第1部材
2 第2部材

請求の範囲

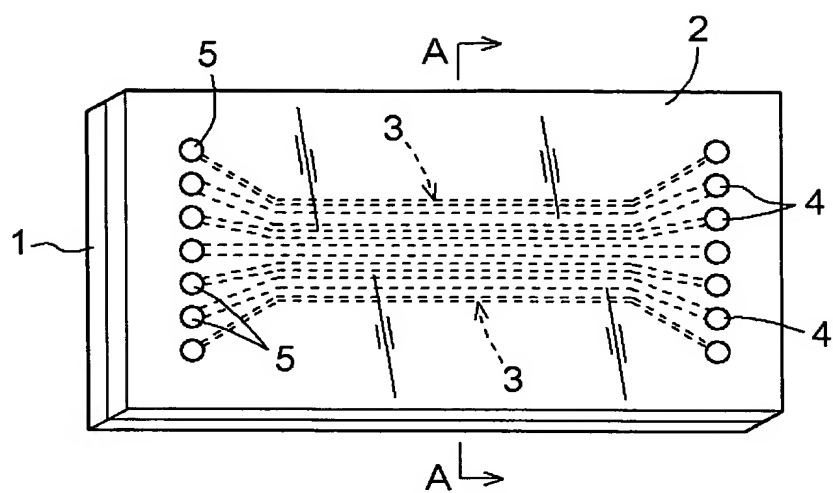
- [1] 第1部材と第2部材との間に生体関連分子を担持する生体関連分子バイオチップであって、
前記第1部材もしくは前記第2部材の何れか一方において、他方の部材に対する接触面に複数の溝を並列形成し、反応領域となる空間を複数設けてある生物関連分子バイオチップ。
- [2] 第1部材と第2部材との間に生体関連分子を担持する生体関連分子バイオチップであって、
前記第1部材および前記第2部材の互いの接触面に複数の溝を並列形成し、反応領域となる空間を複数設けてある生物関連分子バイオチップ。
- [3] 第1部材と第2部材との間に生体関連分子を担持する生体関連分子バイオチップであって、
前記第1部材には、前記第2部材に対する接触面に複数の線形凸部を並列形成し、前記第2部材には、前記第1部材に対する接触面に前記線形凸部と一対一に嵌合可能な複数の線形溝部を並列形成し、
前記線形凸部と前記線形溝部とを嵌合させつつ、前記第1部材と前記第2部材とを当接させたとき、前記線形凸部と前記線形溝部との間に反応領域となる空間が形成されるように構成してある生物関連分子バイオチップ。
- [4] 前記反応領域と外部を連通可能とし、前記反応領域に試料を供給する試料供給口と反応領域から試料を回収する試料回収口を設けてある請求項1〜3のいずれか1項に記載の生体関連分子バイオチップ。
- [5] 前記第1部材および前記第2部材のうち少なくとも何れか一方を構成する基材が、ポリジメチルシロキサン、もしくは、ポリメタクリル酸メチルなど透明シリコンゴムあるいはプラスチック樹脂である請求項1〜3の何れか1項に記載の生体関連分子バイオチップ。
- [6] 生体関連分子を担持する生体関連分子バイオチップであって、
複数の線状反応領域を並設したバイオチップ本体を有する生物関連分子バイオチップ。

- [7] 前記バイオチップ本体を構成する基材が、ポリジメチルシロキサン、もしくは、ポリメタクリル酸メチルなど透明シリコンゴムあるいはプラスチック樹脂である請求項6に記載の生体関連分子バイオチップ。
- [8] 互いに当接させる第1部材と第2部材との間に生体関連分子を担持する反応領域を備えた生体関連分子バイオチップであって、前記第1部材および前記第2部材の少なくとも何れか一方がポリジメチルシロキサンで構成してあり、前記ポリジメチルシロキサンの基材中に気体分子を侵入させてある生体関連分子バイオチップ。
- [9] 前記ポリジメチルシロキサンで構成された部材の表面にコーティングを施してある請求項8に記載の生体関連分子バイオチップ。
- [10] 前記コーティングがガス不透過性ポリマーである請求項9に記載の生体関連分子バイオチップ。
- [11] 互いに当接させる第1部材および第2部材の少なくとも何れか一方をポリジメチルシロキサンで構成し、前記第1部材と前記第2部材との間に形成した反応領域に生体関連分子を担持する生体関連分子バイオチップの製造方法であって、前記ポリジメチルシロキサンで構成した部材を真空条件下に維持する工程と、当該真空雰囲気中に所定の気体を供給して、前記ポリジメチルシロキサンの基材中に前記気体の分子を侵入させる工程とを有する生体関連分子バイオチップの製造方法。
- [12] シリコン樹脂表面にオゾンと接触させるオゾン接触工程を行った後、前記シリコン樹脂表面に還元剤と接触させる還元剤接触工程を行うシリコン樹脂の表面改質方法。
- [13] 前記還元剤接触工程を行った後、前記シリコン樹脂表面に表面機能修飾剤と接触させる表面機能修飾剤接触工程を行う請求項12に記載のシリコン樹脂の表面改質方法。
- [14] 前記シリコン樹脂が、ポリジメチルシロキサン(PDMS)を主成分とする請求項13に記載のシリコン樹脂の表面改質方法。
- [15] 前記還元剤が過酸化水素である請求項12～14の何れか一項に記載のシリコン樹脂の表面改質方法。
- [16] 前記表面機能修飾剤がシランカップリング剤である請求項13又は14に記載のシリ

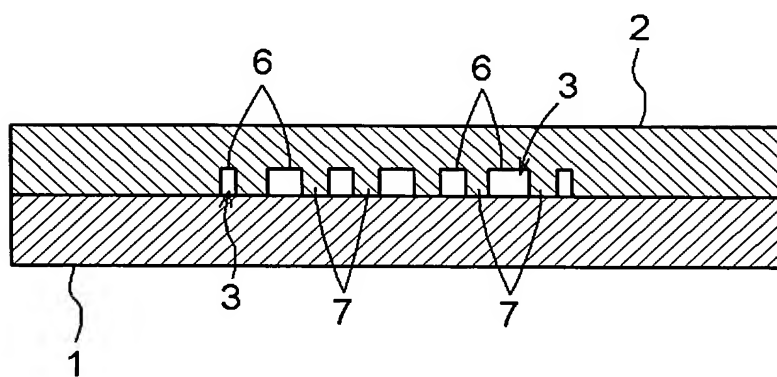
コン樹脂の表面改質方法。

- [17] 前記オゾン接触工程において、前記樹脂表面に対してオゾンを、0.8g/h以上で1〜3時間処理する請求項12〜14の何れか一項に記載のシリコン樹脂の表面改質方法。
- [18] 流体流路と、前記流体流路と接続した反応領域とを設けたバイオチップの温度を調節する温度調節部を設けたバイオチップ反応用温度調節器において、
前記温度調節部が、前記バイオチップを載置する伝熱ブロックと、前記伝熱ブロックと接するペルチェ素子と、前記ペルチェ素子と接する加熱吸熱手段とを順に配設してあるバイオチップ反応用温度調節器。
- [19] 前記加熱吸熱手段と接するヒータを設けてある請求項18に記載のバイオチップ反応用温度調節器。
- [20] 反応領域を設けたバイオチップの温度を調節する温度調節部を設けたバイオチップ反応用温度調節器において、
前記バイオチップが、反応液を注入する注入孔と、前記反応液を反応させる反応領域と、前記反応液を排出する排出孔と、前記注入孔と前記反応領域とを連通させる第一流路と、前記反応領域と前記排出孔とを連通させる第二流路とを基板上に付設して構成してあるとき、
前記温度調節部を複数設けて、少なくとも前記第一流路の一部と前記第二流路の一部とを含む領域を冷却自在に構成し、少なくとも前記反応領域を含む領域を加熱或いは冷却自在に構成してあるバイオチップ反応用温度調節器。

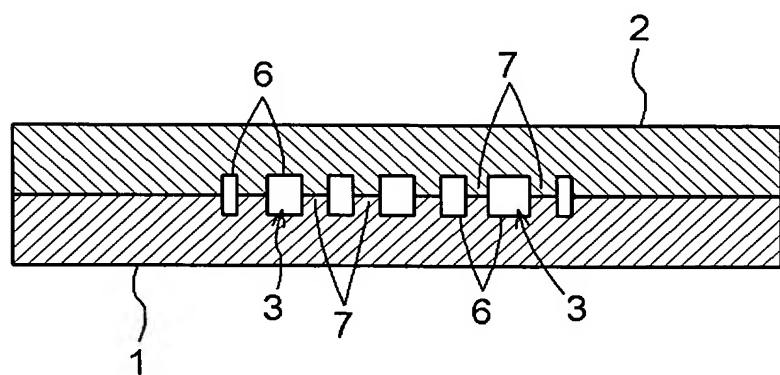
[図1]



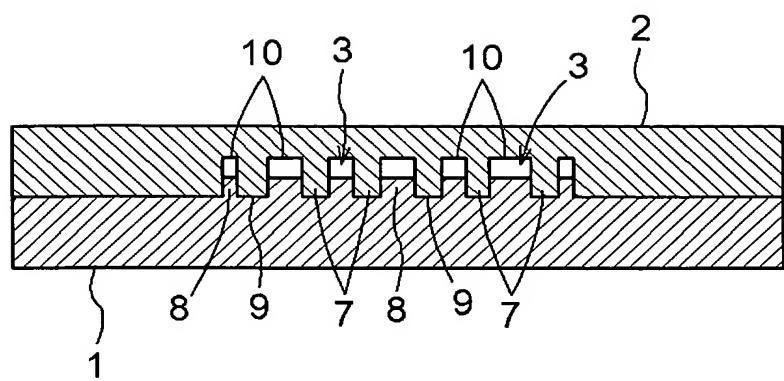
[図2]



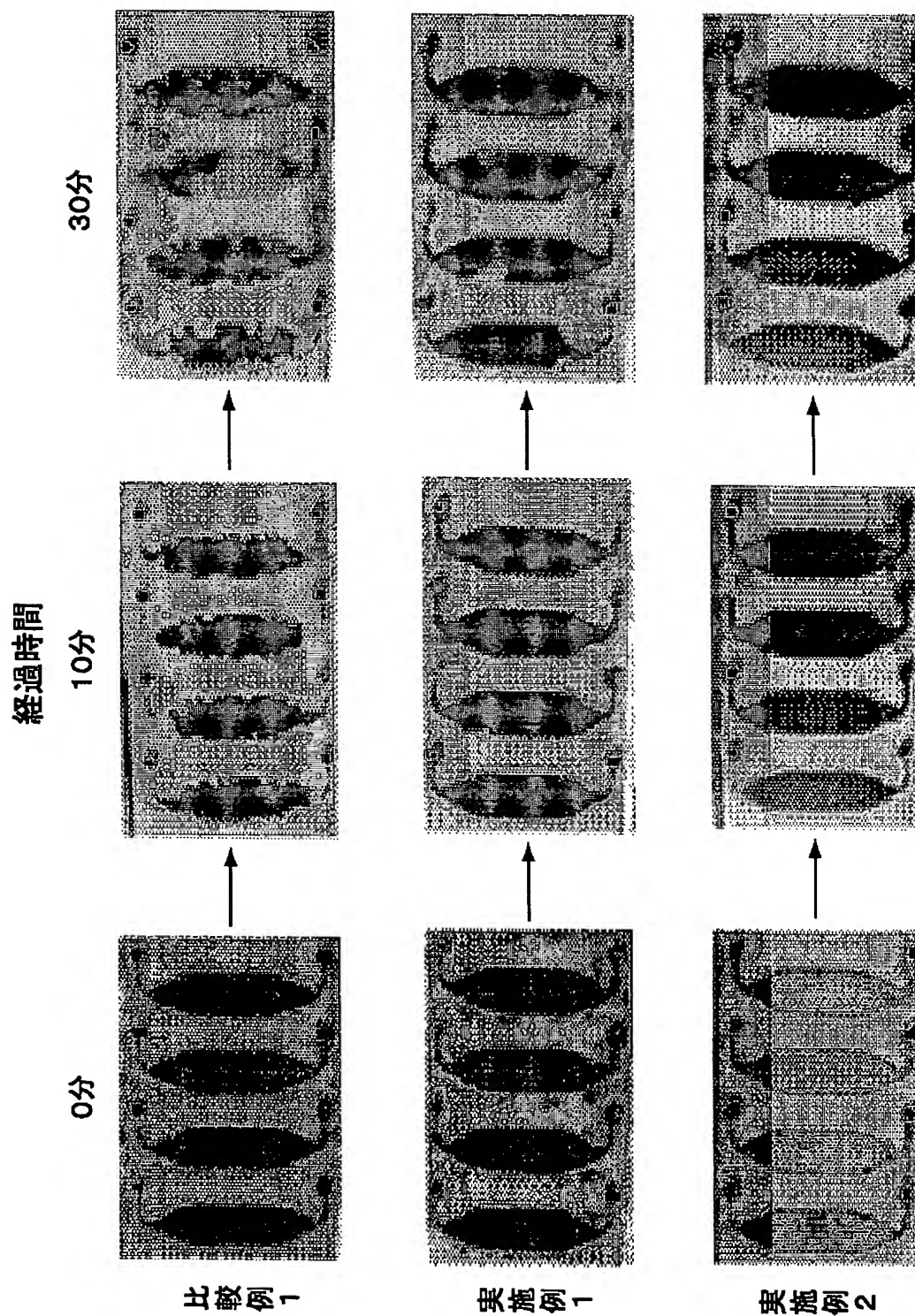
[図3]



[図4]

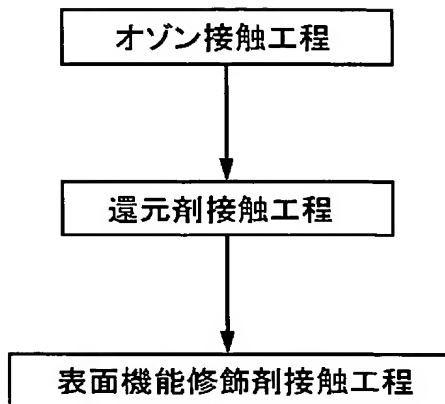


[図5]

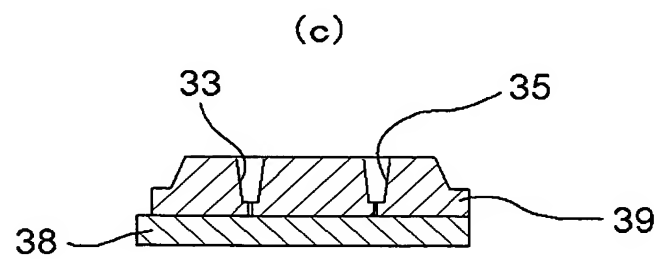
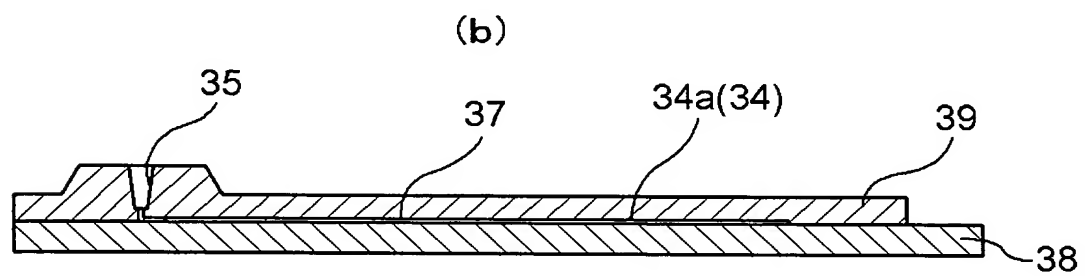
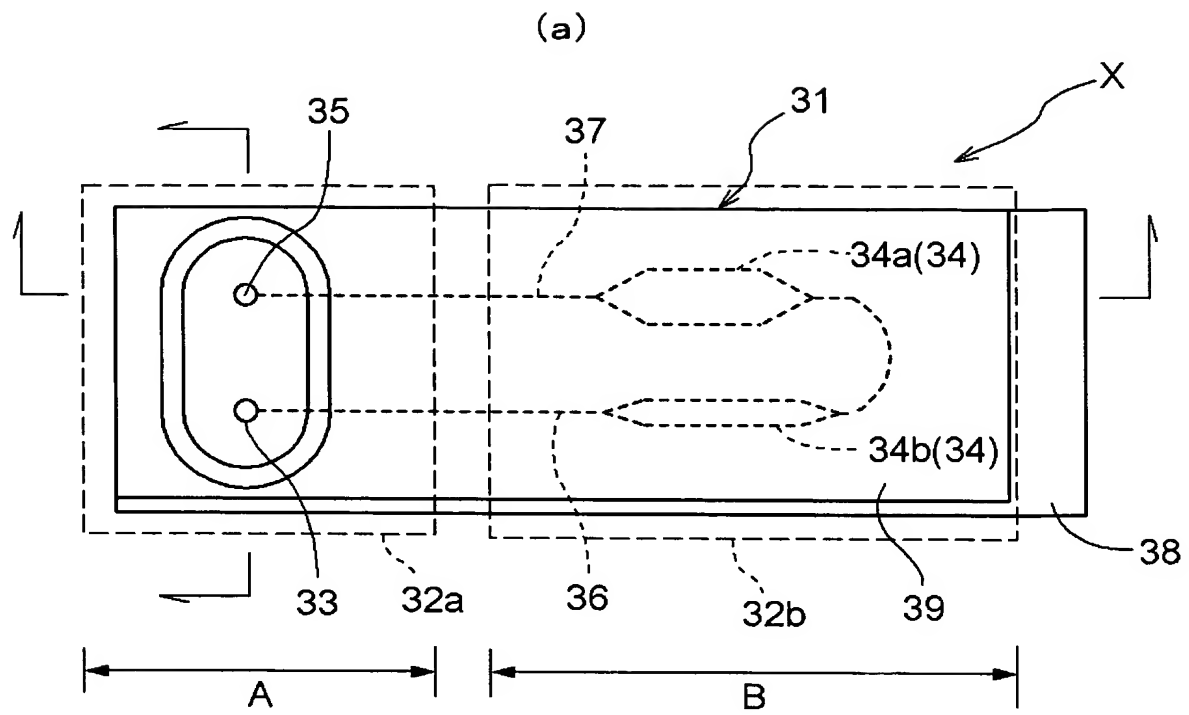


BEST AVAILABLE COPY

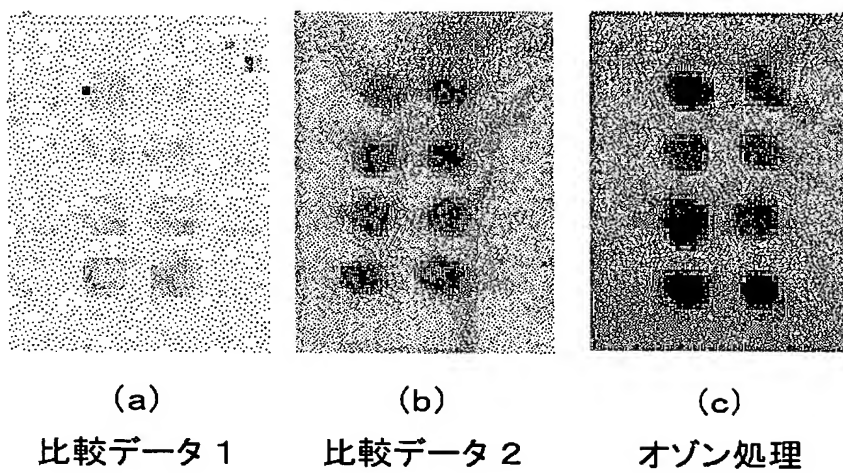
[図6]



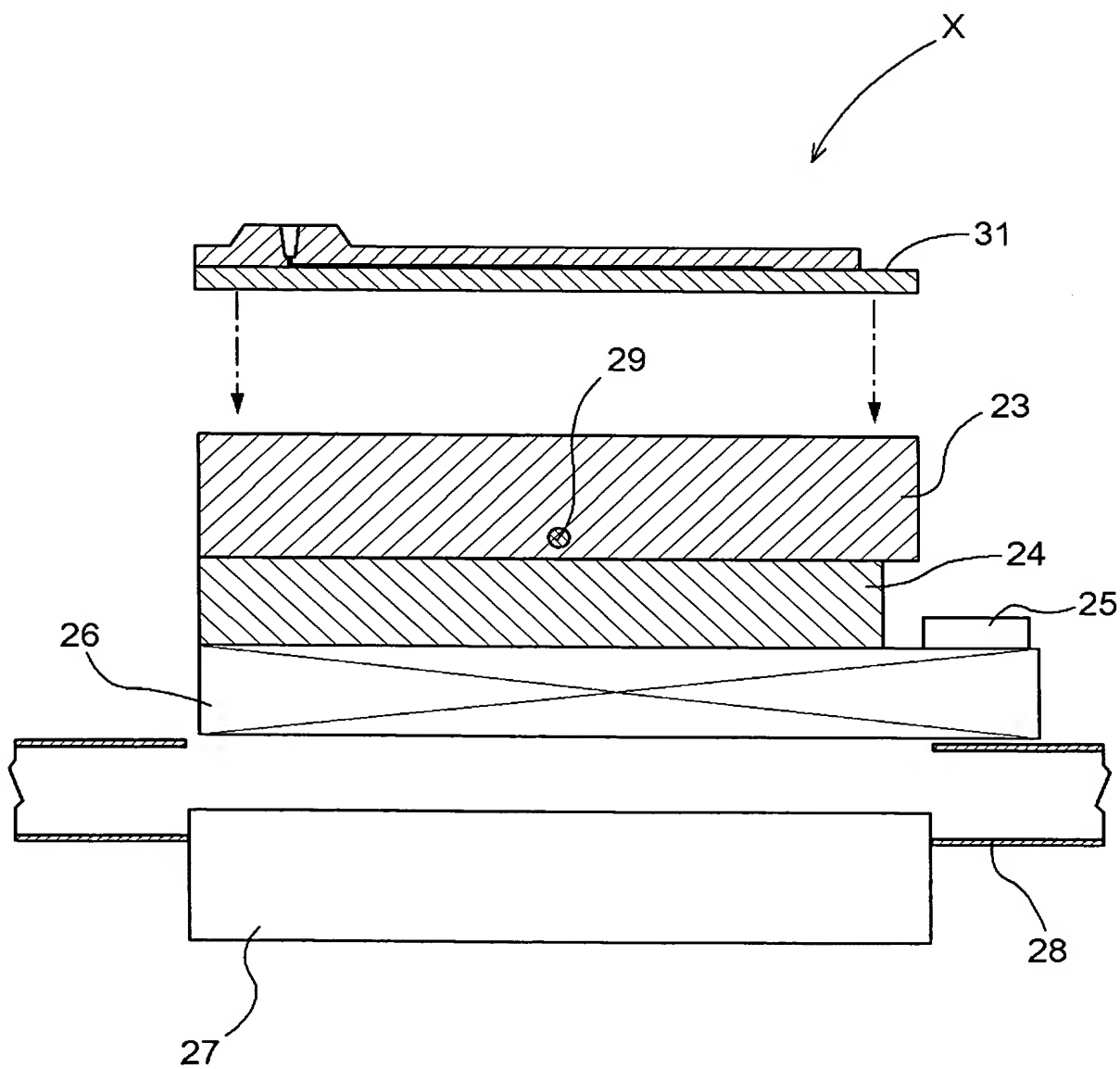
[図7]



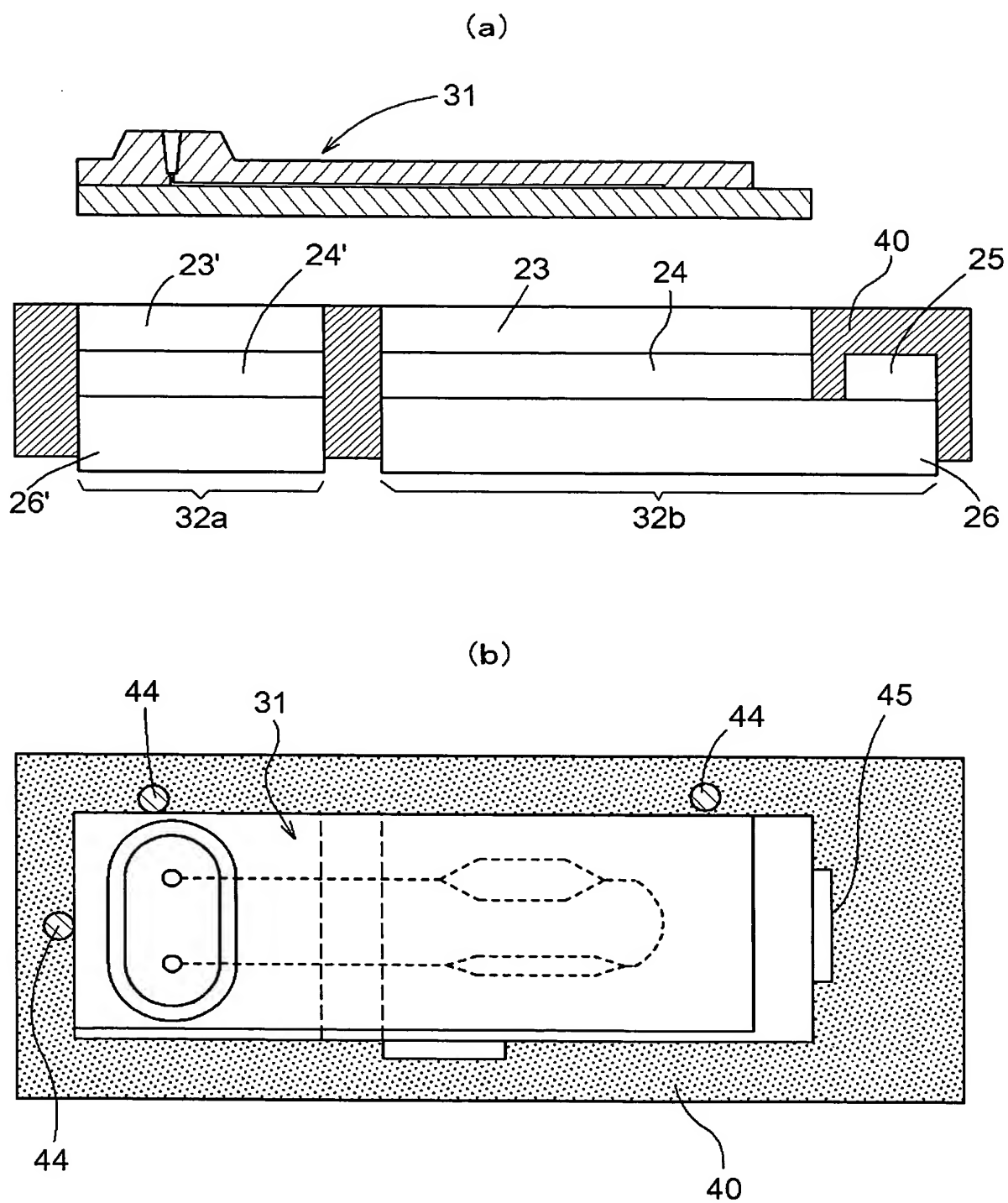
[図8]



[図9]



[図10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/009423

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ G01N33/53, G01N37/00, C12N15/09, C12M1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ G01N33/53, G01N37/00, C12N15/09, C12M1/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2004
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2004 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2004

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA (STN), JICST (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 2002-357607 A (Olympus Optical Co., Ltd.), 13 December, 2002 (13.12.02), Par. Nos. [0031], [0032], [0034]; Figs. 4, 5 (Family: none)	1-9 10-20
X A	JP 2002-221485 A (Minolta Co., Ltd.), 09 August, 2002 (09.08.02), Par. Nos. [0034], [0052]; Fig. 1 & US 2002/064800 A	1-9, 11 10, 12-20
X A	JP 2001-326209 A (Mitsubishi Materials Silicon Corp.), 22 November, 2001 (22.11.01), Claims 2, 3; Par. No. [0001] (Family: none)	12-14, 17 1-11, 15, 16, 18-20

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
09 August, 2004 (09.08.04)

Date of mailing of the international search report
24 August, 2004 (24.08.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/009423

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 2002-306154 A (Hitachi Electronics Engineering Co., Ltd.), 22 October, 2002 (22.10.02), Par. No. [0018]; Figs. 1, 4 (Family: none)	18-19 1-17, 20
A	JP 2004-501372 A (Merck Patent GmbH.), 15 January, 2004 (15.01.04), & EP 1292822 A & US 2003/161572 A & WO 01/98759 A	1-20
A	JP 2002-159285 A (Shimadzu Corp.), 04 June, 2002 (04.06.02), (Family: none)	1-20
A	JP 2002-85961 A (The Institute of Physical and Chemical Research), 26 March, 2002 (26.03.02), & US 2002/094303 A	1-20
A	JP 2001-255328 A (Hitachi Software Engineering Co., Ltd.), 21 September, 2001 (21.09.01), & EP 1132485 A & US 2002/022226 A	1-20

BEST AVAILABLE COPY

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/009423

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
 "The special technical feature" of the inventions according to claims 1 to 7 is an organism-related molecule bio-chip in which an organism-related molecule is carried between a first member and a second member, wherein one of the first member and the second member has a plurality of grooves formed in parallel in the face contacting the other member, to thereby provide a plurality of spaces as reaction regions.

(To be continued to extra sheet.)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims, it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

BEST AVAILABLE COPY

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/009423

Continuation of Box No. III of continuation of first sheet (2)

"The special technical feature" of the inventions according to claims 8 to 11 is to allow molecules of a gas to permeate into a polydimethylsiloxane substrate of an organism-related molecule bio-chip which has a reaction region having an organism-related molecule carried between a first member and a second member.

"The special technical feature" of the inventions according to claims 12 to 17 is a method for modifying the surface of a silicone resin, which comprises an ozone contact step of contacting the surface of a silicone resin with ozone, and a reducing agent contact step of contacting the surface of the silicone resin with a reducing agent.

"The special technical feature" of the inventions according to claims 18 and 19 is a temperature controller for a bio-chip reaction in which a heat conducting block having a biochip placed thereon, a Peltier element contacting with the heat conducting block and a heating and heat-absorbing means are arranged in this order.

"The special technical feature" of the inventions according to claims 20 is the matter that, in a temperature controller for a bio-chip reaction having a temperature controlling section for controlling the temperature of a bio-chip having a reaction region, the bio-chip comprises an injection hole for injecting a liquid reaction mixture, a reaction region for reacting the liquid reaction mixture, an outlet for discharging the liquid reaction mixture, a first flow path for the communication of the injection hole and the reaction region and a second flow path for the communication of the reaction region and the outlet, which are provided on a substrate, and a plurality of the above temperature controlling sections are provided to thereby render a zone containing at least a part of the first flow path and a part of the second flow path to be cooled as desired and render a zone containing at least the reaction region to be heated and cooled as desired.

BEST AVAILABLE COPY

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ G01N33/53, G01N37/00, C12N15/09, C12M1/00		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ G01N33/53, G01N37/00, C12N15/09, C12M1/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2004年 日本国登録実用新案公報 1994-2004年 日本国実用新案登録公報 1996-2004年		
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
CA (STN)、JICST (JOIS)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 2002-357607 A (オリンパス光学工業株式会社)	1-9
A	2002. 12. 13 【0031】、【0032】、【0034】、図4、図5 (ファミリーなし)	10-20
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
09. 08. 2004	24. 8. 2004	
国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官 (権限のある職員)	2 J 3 3 1 2
日本国特許庁 (ISA/JP)	山村 祥子	
郵便番号100-8915	電話番号 03-3581-1101	内線 3251
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 2002-221485 A (ミノルタ株式会社) 2002. 08. 09 【0034】、【0052】、図1	1-9, 11
A	& US2002/064800 A	10, 12-20
X	JP 2001-326209 A (三菱マテリアルシリコン株式会社) 2001. 11. 22 【請求項2】、【請求項3】、【0001】	12-14, 17
A	(ファミリーなし)	1-11, 15, 16, 18-20
X	JP 2002-306154 A (日立電子エンジニアリング株式会社) 2002. 10. 22 【0018】、図1、図4	18-19
A	(ファミリーなし)	1-17, 20
A	JP 2004-501372 A (メルク パテント ゲゼル シャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング) 2004. 01. 15 & EP1292822 A & US2003/161572 A & WO01/98759 A	1-20
A	JP 2002-159285 A (株式会社島津製作所) 2002. 06. 04 (ファミリーなし)	1-20
A	JP 2002-85961 A (理化学研究所) 2002. 03. 26 & US2002/094303 A	1-20
A	JP 2001-255328 A (日立ソフトウェアエンジニアリング) 2001. 09. 21 & EP1132485 A & US2002/022226 A	1-20

BEST AVAILABLE COPY

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-7に係る発明の「特別な技術的特徴」は、第1部材と第2部材との間に生体関連分子を担持する生体関連分子バイオチップであって、複数の溝を並列形成し、反応領域となる空間を複数設けてある生物関連分子バイオチップである。

請求の範囲8-11に係る発明の「特別な技術的特徴」は、第1部材と第2部材との間に生体関連分子を担持する反応領域を備えた生体関連分子バイオチップのポリジメチルシロキサン基材中に気体分子を侵入させることである。

請求の範囲12-17に係る発明の「特別な技術的特徴」は、シリコン樹脂表面にオゾンを接触させるオゾン接触工程を行った後、前記シリコン樹脂表面に還元剤を接触させる還元剤

続葉あり(1/2)

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

第Ⅲ欄の続き

接触工程を行うシリコン樹脂の表面改質方法である。

請求の範囲18、19に係る発明の「特別な技術的特徴」は、バイオチップを載置する伝熱ブロックと、伝熱ブロックと接するペルチェ素子と、ペルチェ素子と接する加熱吸熱手段とを順に配設してあるバイオチップ反応用温度調節器である。

請求の範囲20に係る発明の「特別な技術的特徴」は、反応領域を設けたバイオチップの温度を調節する温度調節部を設けたバイオチップ反応用温度調節器において、前記バイオチップが、反応液を注入する注入孔と、前記反応液を反応させる反応領域と、前記反応液を排出する排出孔と、前記注入孔と前記反応領域とを連通させる第一流路と、前記反応領域と前記排出孔とを連通させる第二流路とを基板上に付設して構成してあるとき、前記温度調節部を複数設けて、少なくとも前記第一流路の一部と前記第二流路の一部とを含む領域を冷却自在に構成し、少なくとも前記反応領域を含む領域を加熱或いは冷却自在に構成してあることである。

続葉なし(2/2)